

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**LINFOMA ESPLÉNICO DE LA ZONA MARGINAL:
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Elena María Ruiz Ballesteros

Bajo la dirección de los doctores

Miguel Ángel Piris Pinilla
Manuela Mollejo Villanueva

Madrid, 2010

• ISBN: 978-84-693-4094-3

© Elena María Ruiz Ballesteros, 2009

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**LINFOMA ESPLÉNICO DE LA ZONA
MARGINAL.
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.**

TESIS DOCTORAL
Septiembre 2009

Elena María Ruiz Ballesteros

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



LINFOMA ESPLÉNICO DE LA ZONA MARGINAL.
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

TESIS DOCTORAL

Doctorando:

Elena María Ruiz Ballesteros

Directores:

Dr. Miguel Ángel Piris Pinilla

Dra. Manuela Mollejo Villanueva

Director-tutor: Dr. Guillermo Velasco Díez

Septiembre 2009

Madrid, a 28 de Agosto de 2009

Dra. Manuela Mollejo Villanueva, Médico especialista de área de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Salud de Toledo

Dr. Miguel Ángel Piris Pinilla, Director del Programa de Patología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas,

CERTIFICAN que:

D^a Elena María Ruiz Ballesteros ha realizado bajo nuestra dirección la tesis doctoral cuyo título es: **“LINFOMA ESPLÉNICO DE LA ZONA MARGINAL. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR”** que a nuestro juicio reúne plenamente los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor, siendo tutor de la tesis el Dr. Guillermo Velasco Díez, Profesor Asociado del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Esta tesis representa un trabajo original que ha dado lugar a publicaciones relevantes en revistas internacionales de alto índice de impacto con sistema de revisión por pares, que han contribuido de manera muy significativa al conocimiento y estado actual del tema tratado, y que han sido acogidas con gran interés por la comunidad científica, abriendo nuevas perspectivas para la comprensión, el diagnóstico y el tratamiento de los linfomas B esplénicos.

Las aportaciones originales de su trabajo han sido:

- El reconocimiento como entidad molecular única del Linfoma Esplénico de la Zona Marginal.
- La identificación de una firma molecular propia de este tipo de linfoma.
- Las propuestas sobre nuevos marcadores de interés diagnóstico y terapéutico

Y para que conste, firmamos el presente certificado



Fdo. Dra. Manuela Mollejo Villanueva



Fdo.: Dr. Miguel Ángel Piris Pinilla

La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin la colaboración, el apoyo y el ánimo por parte de muchas personas a las cuales me gustaría mostrar mi agradecimiento.

Agradecer en primer lugar al Dr. Miguel Ángel Piris, por la confianza depositada en mí durante todo este tiempo, poniendo a mi disposición la oportunidad de trabajar en colaboración con un equipo de excelentes investigadores, con todos los medios necesarios a mi alcance. Un premio trabajar bajo su dirección, ni un solo día dejó de sorprenderme su gran capacidad investigadora y calidad científica.

A la Dra. Manuela Mollejo, la otra directora de esta tesis, por su constante entusiasmo y optimismo, por su gran profesionalidad que se ha visto reflejada en mi trabajo, por sus enseñanzas y por sus minuciosas correcciones en la redacción de esta tesis.

A la Dra. Patricia Algara, por ser mi maestra en el laboratorio de Genética desde el día cero, gracias por transmitirme los conocimientos básicos en biología molecular, por su apoyo fundamental en mis inicios y por su imprescindible colaboración en la corrección y valoración final del texto.

A los tres quiero agradecer especialmente haberme guiado en esta apasionante aventura.

A los otros componentes del servicio de Genética del Hospital Virgen de la Salud de Toledo, empezando por el jefe, Pedro Martínez, por haberme permitido desarrollar gran parte del trabajo en su servicio. Dos personas que además de contribuir en esta tesis van a seguir significando mucho para mí tanto en lo personal como en lo profesional: Carmen Granda y Yolanda Vicente, sin ellas hubiera sido imposible, gracias por vuestra escrupulosa labor. A los demás compañeros por estar siempre ahí, a Marisol por su preocupación y por colaborar con su trabajo para abrir más de una puerta a esta nueva investigación, a Yoli Ruano, Elisa, Yoli Campos, Alberto, Gema, Vanesa, Sonsoles, Carles, Pedrulo, Fermina, Chelo, Concha, M^a José, Alicia, a todos, gracias.

A la gente que he tenido oportunidad de conocer en el CNIO, todos espléndidos profesionales y mejores personas, Raquel, May, Fani, Lydia, Juanfer, Nerea, Toñi, Abel, M^a Jesus, Diego, Lorraine,... un auténtico placer poder trabajar a su lado, aprendiendo constantemente. Al personal colaborador en la Red Nacional del Banco de Tumores. A Elena, por su riguroso trabajo como técnico de Anatomía. A Laura y a Mari Carmen por su imprescindible labor administrativa. A Marina Pollán, por su ayuda esencial con los análisis estadísticos.

A los que están y a los que ya se fueron, MIL GRACIAS.

A mi tutor, Guillermo Velasco, por su ayuda y ánimo prestado en las diferentes etapas hasta llegar a la finalización de esta tesis.

A mis padres, por ser el más claro ejemplo de superación que he podido tener y a Salva, el informático en casa, mi principal apoyo. Os quiero mucho. Gracias.

Y finalmente, por ser las fuentes de financiación mayoritarias en la elaboración de la presente Tesis Doctoral quisiera agradecer al Ministerio de Sanidad y Consumo, al Ministerio de Ciencia y Tecnología, a las Consejerías de Sanidad de la Junta de Comunidades de Castilla La Mancha y de la Comunidad Autónoma de Madrid, al Servicio de Salud de Castilla la Mancha (SESCAM) y a las fundaciones científicas de la Caixa y la Asociación Española Contra el Cáncer.

A MIS PADRES
Y A ELISA



INDICE

Pág.

INTRODUCCIÓN.....	9
1 La clasificación actual de los linfomas.....	9
2 El Bazo y los linfocitos B de la zona marginal.....	11
3 Linfoma Esplénico de la Zona Marginal.....	15
3.1 Cuadro clínico.....	15
3.2 Criterios diagnósticos.....	16
3.2.1 Morfología e inmunofenotipo.....	17
3.2.1.1 Bazo.....	17
3.2.1.2 Médula ósea.....	18
3.2.1.3 Sangre periférica.....	18
3.2.1.4 Ganglios linfáticos.....	19
3.3 Hallazgos moleculares.....	19
3.3.1 Alteraciones Citogenéticas (Deleción en 7q).....	20
3.3.2 Hipermutación somática (<i>IgV_H</i> y <i>BCL6</i>).....	21
3.3.3 Mutaciones en <i>P53</i>	22
3.4 Diagnóstico diferencial.....	22
3.5 Tratamiento.	24
3.6 Factores pronósticos.	25
4 Análisis del perfil de expresión génica con micromatrices en cáncer.....	26
4.1 Estudios con micromatrices de ADN en Linfomas.....	28
4.1.1 Estudios con micromatrices de ADN en LBCP.....	29
4.1.2 Implicación de las vías de señalización dependientes de NF-κB.....	31
4.2 Validación.....	32
4.2.1 PCR cuantitativa a tiempo real.....	33
4.2.2 Matrices de tejido o TMA.....	33
5 MicroRNAs.....	34
5.1 Definición.....	34
5.2 Implicación en cáncer.....	36

5.3 miRNAs en Linfomas.....	37
5.3.1 miRNAs localizados en 7q.....	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
1 Casos incluidos en el estudio.....	47
2 Metodología.....	48
2.1 Micromatrices de ADNc.....	48
2.1.1 Obtención de ARN.....	49
2.1.2 Marcaje.....	49
2.1.3 Hibridación.....	49
2.1.4 Lectura de la fluorescencia.....	50
2.1.5 Preprocesado de los datos y análisis de los resultados de expresión génica.....	50
2.1.6 Validación mediante PCR cuantitativa a Tiempo Real (Sondas <i>Taqman</i>).....	51
2.2 Técnicas de Inmunohistoquímica.....	53
2.2.1 Matrices de Tejido o TMA.....	54
2.2.1.1 Lectura de resultados.....	54
2.3 Estudio de mutaciones somáticas en <i>IgV_H</i>	54
2.4 <i>Western Blotting (WB)</i>	56
2.5 Inmunofluorescencia.....	57
2.6 Análisis de la expresión de miRNAs.....	58
2.6.1 Separación de células B esplénicas con microesferas magnéticas.....	58
2.6.2 PCR cuantitativa (<i>SYBR GREEN</i>)	58
2.7 Análisis estadísticos.....	60
RESULTADOS	63
1 Análisis del patrón de expresión en LEZM.....	63

1.1 Datos clínicos de la serie.....	63
1.2 Expresión génica (Micromatrices de ADNc).....	63
1.2.1 Firma molecular.....	64
1.2.2 Genes sobreexpresados.....	65
1.2.3 Genes reprimidos (delección de 7q31-32).....	67
1.2.4 Diagnóstico diferencial de LEZM frente a otros LBCP.....	69
1.2.5 Análisis de supervivencia en base al perfil de expresión génica.....	70
1.2.6 Validación Cuantitativa.....	72
1.3 Expresión de proteínas (TMA).....	73
1.3.1 Perfil de expresión de proteínas.....	73
1.3.2 Análisis de supervivencia.....	74
1.4 Hipermutación somática en IgV _H	75
1.4.1 Análisis comparativo entre el fenómeno de hipermutación somática en IgV _H y patrón de expresión en LEZM.....	76
1.5 Integración de los análisis de supervivencia: Propuestas para nuevos marcadores con valor pronóstico.....	77
2 Validación y demostración de funcionalidad de las rutas encontradas como relevantes en LEZM.....	78
3 Estudio de expresión de miRNAs en la zona frecuentemente perdida en 7q.....	82
3.1 miRNAs de 7q implicados en la desregulación de la firma molecular de LEZM.....	85
DISCUSIÓN.....	89
1 Importancia del análisis molecular con micromatrices en la clasificación de los LEZM.....	89
2 Profundización en la patogenia molecular de las células neoplásicas de los LEZM.....	90
2.1 Rutas claves en la patogenia de los LEZM.....	91
3 ¿Son las pérdidas en 7q el evento oncogénico inicial para el desencadenamiento del proceso neoplásico en los LEZM?.....	95

4 Avances en el diagnóstico diferencial frente a otros LBCP.....	96
5 Aspectos pronósticos.....	97
6 Propuestas para nuevas dianas de actuación terapéutica.	99
CONCLUSIONES.....	103
BIBLIOGRAFÍA.....	107
ANEXO.....	119
 I. ARTÍCULO 1: Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. <i>Blood</i> ;106(5):1831-1838. 2005.....	 119
 II. ARTÍCULO 2: MicroRNA losses in the frequently deleted region of 7q in SMZL. <i>Leukemia</i> ;21(12):2547-2549. 2007.	 121
 III. RELACIÓN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	 123
 ABREVIATURAS.....	 127



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1 La clasificación actual de los linfomas.

Los linfomas forman parte del grupo de neoplasias hematológicas originadas en células B, T o NK en sus distintos estadios de diferenciación.

Los distintos tipos de linfomas están incluidos en la última clasificación de tumores hematopoyéticos y de tejido linfoide propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicada en 2008 (Swerdlow, 2008). Esta clasificación actualiza la versión del año 2001 (Jaffe, 2001) y se basa en la antigua clasificación de la *REAL* (Harris, 1994). Estos sistemas intentan agrupar los distintos tipos de síndromes linfoproliferativos en relación a las sub-poblaciones de linfocitos normales de las que supuestamente se originan.

Las ramas principales de la clasificación actual de los linfomas son:

- Neoplasias de precursores linfoides: Leucemias B y T linfoblásticas.
- Neoplasias de células B maduras: Incluyen linfomas B de célula grande (LBCG) y de célula pequeña (LBCP).
- Neoplasias de células T maduras y NK (*natural killer*).
- Linfoma de Hodgkin.
- Síndromes linfoproliferativos post-trasplante.

En ella se describen los criterios clínicos, morfológicos e inmunofenotípicos de cada una de las categorías junto con datos derivados de estudios moleculares y genéticos.

Tabla 1. Neoplasias de células B maduras según la clasificación actual de la OMS.

NEOPLASIAS DE CÉLULAS B MADURAS:
<p>Leucemia linfocítica crónica / Linfoma de linfocitos pequeños. Leucemia prolinfocítica tipo B. Linfoma B esplénico de la zona marginal. Leucemia de células peludas. Linfoma linfoplasmacítico. Enfermedades de las cadenas pesadas. Neoplasias de células plasmáticas. Linfoma de la zona marginal extra-ganglionar del tejido linfoide asociado a mucosas (linfoma MALT). Linfoma de la zona marginal ganglionar. Linfoma folicular. Linfoma B del centro folicular cutáneo primario . Linfoma de las células del manto. Linfoma B difuso de células grandes. Linfoma B difuso de células grandes asociado a inflamación crónica. Granulomatosis linfomatoide. Linfoma B de células grandes mediastínico (de timo) primario. Linfoma B de células grandes intravascular. Linfoma B de células grandes ALK positivo. Linfoma plasmablastico. Linfoma B de células grandes originado en enfermedad multicéntrica de Castleman asociada a HHV8. Linfoma primario de cavidades. Linfoma de Burkitt. Linfoma de células B inclasificable, con rasgos intermedios entre linfoma B difuso de células grandes y linfoma de Burkitt. Linfoma de células B inclasificable, con rasgos intermedios entre linfoma B difuso de células grandes y linfoma de Hodgkin clásico.</p>

Dentro de las neoplasias de células B maduras, reconocidas por la OMS y enumeradas en la Tabla 1, los **LBCP** conforman un grupo heterogéneo de procesos linfoproliferativos que representan un 50% de los casos de linfoma B y que incluyen:

- Linfoma Folicular (LF).
- Linfoma de Células del Manto (LCM).
- Leucemia Linfocítica Crónica-B (LLC-B)/linfoma linfocítico.
- Linfomas de la Zona Marginal Extraganglionar tipo MALT (Tejido linfoide asociado a mucosas)
- Linfomas de la Zona Marginal Ganglionar o Nodal (LZMG).
- **Linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM).**
- Linfoma Linfoplasmacítico (LPL).
- Neoplasias de células plasmáticas.

2 El Bazo y los linfocitos B de la zona marginal.

Brevemente, el **bazo** es uno de los órganos linfoides secundarios más importantes. Pesa alrededor de 150g y se localiza en el cuadrante superior izquierdo del abdomen. Recibe su irrigación a través de una arteria esplénica única, que perfora la cápsula en el hilio y se divide progresivamente en ramas más pequeñas que están rodeadas por trabéculas fibrosas protectoras y de sostén. En este órgano se distinguen dos compartimentos principales, la pulpa roja y la pulpa blanca:

En la **pulpa roja** tienen lugar los fenómenos de destrucción fisiológica de eritrocitos y la mielopoyesis o generación de nuevos eritrocitos, granulocitos y plaquetas. Se constituye por un entramado de arteriolas esplénicas que terminan en sinusoides y senos venosos que drenan la sangre en la vena esplénica alcanzando la circulación portal. El componente mayoritario en la pulpa roja son los eritrocitos, seguido de los macrófagos y las células dendríticas. El componente linfoide en este compartimento no es muy abundante pero queda constituido por los linfocitos T y las células plasmáticas periarteriolas (vaina periarteriole).

En la **pulpa blanca** tiene lugar la respuesta inmune frente a los antígenos que transporta la sangre. A la pulpa blanca llegan la arteria esplénica y los capilares arteriales y el flujo continúa por las venas o vasos linfáticos eferentes. Contiene, por tanto, todos los tipos celulares necesarios para elaborar la respuesta inmune: linfocitos B y T, células NK, macrófagos.

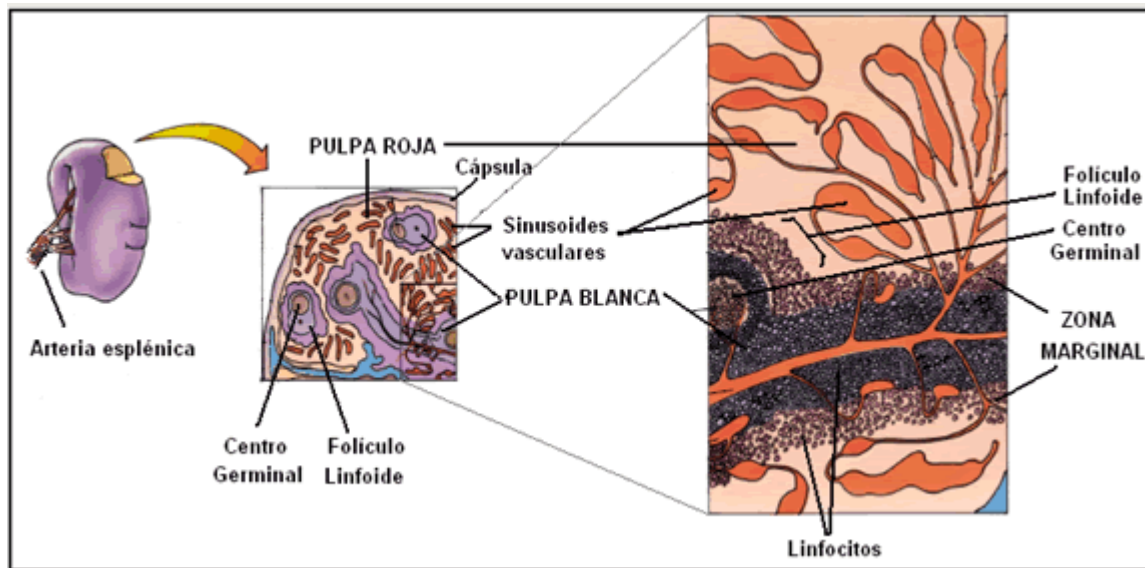


Figura 1. Histología del Bazo. Esquema representativo de la pulpa roja, la pulpa blanca y de un folículo linfóide en el bazo. (Modificada de Gartner & Hiatt (2002): "Texto Atlas de Histología" 2ª Ed. Mc Graw Hill)

Los linfocitos B pueden distribuirse formando **folículos linfoides** no estimulados: **primarios**, o sí estimulados por antígeno: **reactivos** o **secundarios**.

En el **folículo linfóide secundario**, donde las células B se multiplican rápidamente tras un estímulo antigénico, se distinguen 3 zonas definidas histológicamente por su morfología celular e inmunofenotipo de los linfocitos B que componen cada una de ellas. Estas tres zonas son: el centro germinal (CG), la zona del manto folicular y la zona marginal (Figura 2).

La **zona marginal** se localiza principalmente envolviendo el manto folicular aunque también se encuentra rodeando a la vaina periarteriolar de la pulpa roja (Figura 1). Su función, por un lado, es la de constituir la primera barrera ante los antígenos transportados por la sangre que penetra por los sinusoides, produciéndose en esta localización el fenómeno de presentación de antígenos que implica la activación de linfocitos una vez en el CG. Por otro lado, también es donde se localizan los linfocitos B ya diferenciados, tras su activación en el CG, convertidos en células plasmáticas o de memoria secretoras de Ig específicas. Está formada, por tanto, por un subgrupo característico de linfocitos B que se encuentran entremezclados con un número variable de macrófagos, células plasmáticas y linfocitos T. Los **linfocitos B de la zona marginal** se han podido distinguir morfológicamente, dentro de la población celular heterogénea de la zona marginal,

por ser **células de tamaño medio y citoplasma claro** con el siguiente inmunofenotipo: **CD20+**, **CD79a+**, **IgM+**, **CD21+**, **Fosfatasa alcalina+**, **CD23-**, **BCL6-**, **IgD-** o débilmente positivo **IgD+/-** (rev. Mollejo, 2005). Adicionalmente, el marcador proteínico **IRTA1** ha sido descrito recientemente como asociado de forma selectiva a células de la zona marginal (Falini, 2003).

El **centro germinal (CG)** es donde se produce la transformación, proliferación y maduración de los linfocitos B tras el estímulo antigénico, con la consiguiente formación de células plasmáticas y células B de memoria. Los tipos celulares que componen el centro germinal son los centroblastos y centrocitos con un inmunofenotipo: **IgM+**, **IgD-**, **CD20+**, **CD10+**, **BCL6+**.

La **zona del manto** es el área que circunscribe al CG. En esta zona la mayoría de células B permanecen en estado de reposo, y son linfocitos B “pre-CG”. El inmunofenotipo es: **IgM+**, **IgD+**, **CD5+**, **CD20+**.

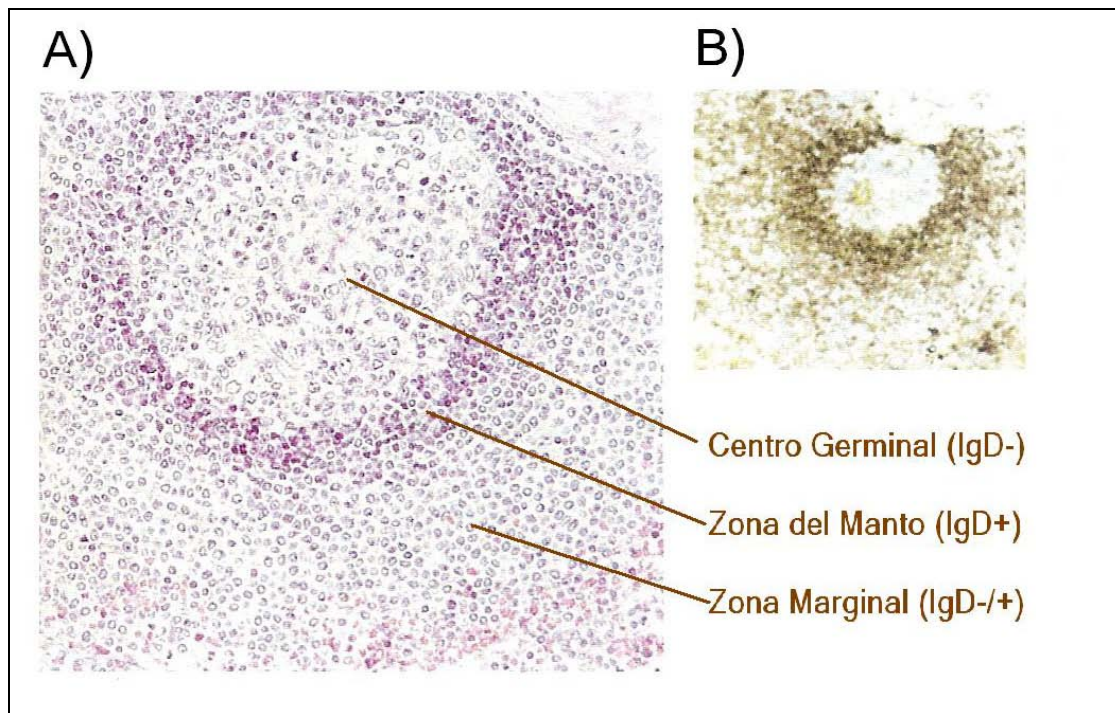


Figura 2. Folículo linfoide reactivo de un bazo normal. Morfología de las distintas zonas: centro germinal, zona del manto y zona marginal tras tinción con hematoxilina/eosina (H&E) (A) e inmunotinción con anti-IgD (B). (Modificada de Mateo *et al. Leukemia*, 2001)

► Zona marginal en otros tejidos: Los linfocitos B de la zona marginal se encuentran en todos los tejidos linfoides secundarios, sin embargo, la zona marginal se hace más evidente en aquellos tejidos en los que hay un flujo antigénico importante. Por ello, aunque fuera primeramente descrita en el bazo, la zona marginal también se observa con claridad en las **placas de Peyer** intestinales, en las **amígdalas palatinas** y en los **ganglios linfáticos mesentéricos** (Van den Oord, 1985; Spencer, 1986; Morente, 1992; Knowles, 2001).

3 Linfoma Esplénico de la Zona Marginal

El LEZM es una neoplasia de células B pequeñas (LBCP), un linfoma B no Hodgkin (LNH) reconocido como entidad clínico-patológica en la clasificación de la OMS y que comprende alrededor de un 2% de todas las neoplasias linfoides.

El término “linfoma esplénico de la zona marginal” fue introducido por Schmid *et al.* en 1992 con una descripción de 4 casos. Su nombre hace referencia a su supuesto origen celular (zona marginal esplénica), basándose exclusivamente en criterios morfológicos. De hecho, las evidencias de que los LEZM puedan derivar de esta zona es objeto de controversia tras los hallazgos moleculares posteriores (Algara, 2002).

3.1 Cuadro clínico

Los LEZM suelen presentarse en individuos mayores de 50 años (rango de 35-85 años) sin preferencia de género (rev. Matutes, 2007) y cursa con los siguientes síntomas o signos clínicos:

- **Esplenomegalia.** Lo más frecuente que refieren los pacientes son los síntomas y signos derivados del agrandamiento del bazo o esplenomegalia, **de grado variable, que llegan a desencadenar molestias o dolor abdominal, además de anemia o trombocitopenia** (Chacon, 2002; Thieblemont, 2003).

- **Linfocitosis** debido a la proliferación descontrolada de linfocitos.

- **Fenómenos autoinmunes.** Un 20% de los casos se presentan al inicio como fenómenos autoinmunes **como por ejemplo la anemia hemolítica autoinmune o la púrpura trombocitopenia idiopática.** (Thieblemont, 2003)

- **Síntomas B.** Algunos pacientes presentan astenia, fiebre o pérdida de peso al diagnóstico.

Se trata de una enfermedad generalmente de curso clínico crónico, de carácter indolente o poco agresivo, con una mediana de supervivencia de alrededor de 10 años (Chacon, 2002; Thieblemont, 2003; Arcaini, 2006). Más del 60% de los pacientes permanecen vivos a los 5 años (Parry-Jones, 2003; Iannitto, 2004).

Los LEZM pueden progresar clínicamente con desarrollo de linfadenopatías, aumento de linfocitos en sangre periférica o infiltración tumoral de otras localizaciones no hematopoyéticas (Chacon, 2002).

Más de un tercio de las muertes en estos pacientes pueden no estar relacionadas con el linfoma sino con otro tipo de neoplasias secundarias o con alteraciones vasculares (Iannitto, 2006).

Como otros LBCP los LEZM pueden sufrir transformación histológica a linfoma B de célula grande (LBCG), algo que ocurre en alrededor de un 10% de los casos y que puede ocasionar la muerte de estos pacientes (Isaacson, 1997; Camacho, 2001)

► Etiopatología: Ciertos hallazgos han sugerido un posible papel patogénico de agentes infecciosos en el desarrollo de los LEZM, como la evidencia de infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en un porcentaje de pacientes con LEZM en el sur de Europa (Saadoun, 2005), así como la relación entre el LEZM y la esplenomegalia hiperreactiva por malaria (Wallace, 1998; Bates, 1997).

3.2 Criterios diagnósticos

Los criterios diagnósticos de los LEZM se han basado históricamente en los rasgos histopatológicos del bazo. Sin embargo, en la actualidad, en muchos casos, la integración de características clínicas, morfológicas e inmunofenotípicas, junto con estudios genéticos en sangre periférica o médula ósea, pueden permitir elaborar un correcto diagnóstico incluso en ausencia del estudio patológico esplénico (rev. Mollejo, 2005).

En la mayoría, si no todos los pacientes, el tumor presenta otras localizaciones adicionales a la esplénica. Estas localizaciones son principalmente la

médula ósea (72-90%) y la **sangre periférica** (64-84%) (Van Huyen, 2000; Chacon, 2002; rev. Mollejo, 2005). Otras, menos frecuentes al diagnóstico, son los **ganglios linfáticos periféricos** y otros órganos como el **hígado** (alrededor de un 20%) (rev. Matutes, 2007).

3.2.1 Morfología e inmunofenotipo

3.2.1.1 Bazo

El tumor en el bazo se caracteriza por un infiltrado linfoide micronodular centrado en la pulpa blanca, con infiltración variable de la pulpa roja, diferenciación marginal y reemplazamiento folicular por células neoplásicas (Figura 3).

En la pulpa blanca, los nódulos están formados por un componente interno de linfocitos pequeños situado en la teórica zona de las células del manto que rodea y reemplaza el centro germinal reactivo, así como de un componente externo de células de mediano tamaño con citoplasma claro, incluyendo alguna célula grande con nucleolo prominente.

En la pulpa roja la infiltración se observa a nivel de los cordones y los sinusoides.

Los linfocitos tumorales pueden mostrar un grado variable de diferenciación plasmacítica. Incluso se puede encontrar paraproteína sérica elevada a nivel clonal, lo que dificulta un diagnóstico diferencial frente a LPL (Van Huyen, 2000).

Con frecuencia también se observan numerosos linfocitos T acompañantes. Inmunofenotipo: CD20+, CD3-, CD23-, CD43-, IgD+, CD5-, CD10-, BCL6-, BCL2+, Ciclina D1- y P27+. Y en un pequeño porcentaje de casos DBA44+ (Mollejo, 1995; Hammer, 1996)

La tinción con BCL2 pone en evidencia el reemplazamiento folicular de las células del centro germinal BCL2- por células BCL2+ tumorales.

La tinción con MIB1 (KI67), marcador del índice proliferativo, indica que el grado de proliferación en estos tumores es bajo y muestra un patrón en diana, destacando el crecimiento tumoral en la zona marginal, y una alta fracción en el centro germinal reactivo residual (Isaacson, 1997).

3.2.1.2 Médula ósea

El tumor en médula ósea muestra un patrón de infiltración en nódulos intertrabecular e intrasinusoidal demostrada con inmunotinción para CD20. Este patrón morfológico, bastante característico, sugiere el diagnóstico de este tipo de linfoma. (Franco, 1996) pero por sí sólo no es suficiente para elaborar un correcto diagnóstico (rev. Matutes, 2007). (Figura 3)

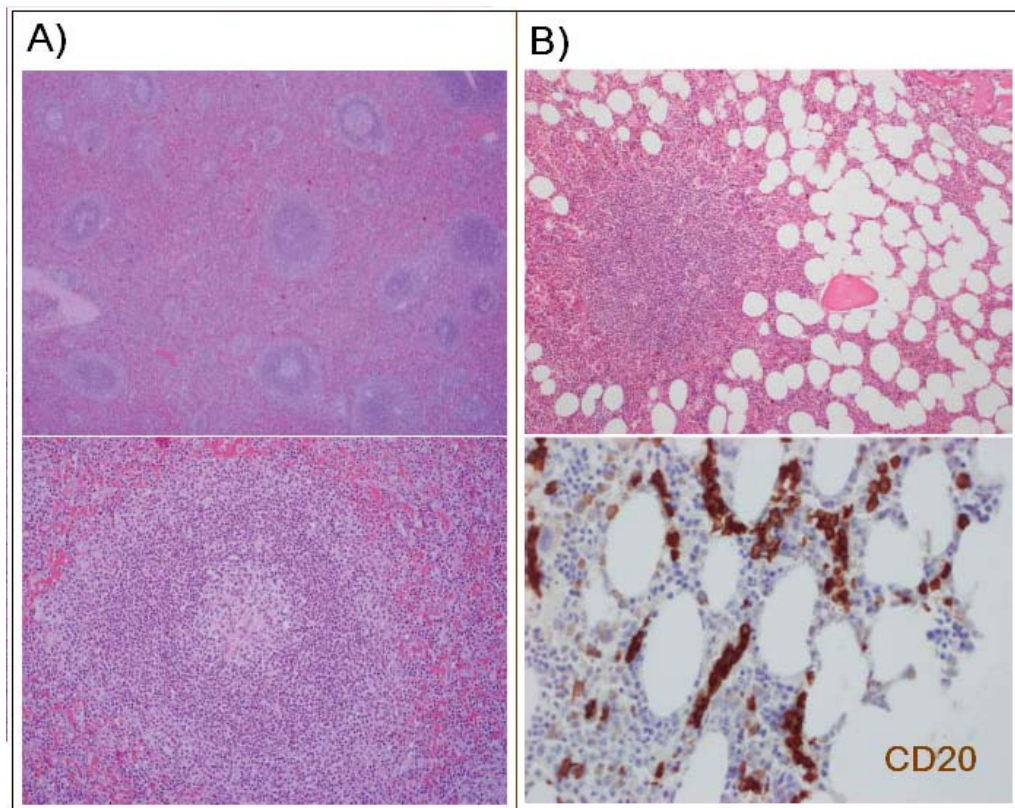


Figura 3. Patrón morfológico característico de los LEZM. Patrón micronodular en bazo tras tinción con H&E con detalle de un folículo linfoide tumoral (abajo) (A) e infiltración en nódulos intertrabecular (H&E) e intrasinusoidal (inmunotinción anti-CD20) en médula ósea (B). (Modificada de rev. Mollejo *et al. Hematological Oncology*, 2005)

3.2.1.3 Sangre periférica

La infiltración en sangre es frecuente en los LEZM y puede detectarse morfológicamente y/o por citometría de flujo en los casos que presenten linfocitosis mínima.

La morfología de infiltración neoplásica en la sangre periférica está formada por linfocitos vellosos, pero además suelen observarse linfocitos B pequeños y linfocitos de tamaño intermedio semejantes a las denominadas células B “monocitoides”. Clásicamente a los LEZM se los denominaba “Linfoma esplénico con linfocitos vellosos”, debido a la frecuente presencia en sangre de estos linfocitos vellosos pero se ha comprobado que no es diagnóstica de esta entidad puesto que hay LEZM que no presentan este tipo morfológico de linfocitos y además, este tipo de células pueden verse en otras enfermedades como LLC, LF o LCM (Isaacson, 1994; Piris, 1998).

Inmunofenotipo por citometría: CD20+, CD22+, CD24+, CD27+, FMC7+, IgD+, IgM+, DBA44 (75%), CD11c (50%). La expresión de CD23, CD5, CD103 y CD25 es poco frecuente.

3.2.1.4 Ganglios linfáticos

El patrón histológico en los ganglios linfáticos también es bastante característico. Presentan un patrón de infiltración vagamente nodular, por centrarse el tumor en los folículos preexistentes, como sucede en el bazo. La citología tumoral está formada fundamentalmente por el componente de linfocitos pequeños y por blastos salpicados. La zona periférica de diferenciación marginal no suele verse en los ganglios (Mollejo, 1997).

3.3 Hallazgos moleculares

Como ocurre en la mayoría de tumores humanos, las alteraciones genéticas más características de los linfomas, incluyen la activación de proto-oncogenes y la inactivación de genes supresores (Gaidano, 1997a).

El mecanismo principal de activación de proto-oncogenes es la traslocación cromosómica, de manera que la presencia de un proto-oncogén en uno de los dos sitios de recombinación desregula su expresión. Por otro lado, la inactivación de genes supresores en estos linfomas se produce generalmente de forma bialélica,

por la combinación de varias alteraciones como son delección, mutación y también por otros mecanismos epigenéticos como la metilación del gen (rev. Chaganti, 2000; rev. Capello, 2000a) o la recientemente reconocida regulación por las moléculas denominadas microRNAs (miRNAs) (rev. Calin, 2006).

Algunas de las categorías dentro de la clasificación de la OMS de linfomas B llevan asociadas una o varias alteraciones genéticas que pueden considerarse su marcador molecular (Jaffe, 2001; Swerdlow, 2008).

Los principales hallazgos moleculares revelados hasta el momento en los LEZM son descritos a continuación:

3.3.1 Alteraciones Citogenéticas (Delección en 7q)

Los estudios citogenéticos en linfomas han representado la herramienta principal para la detección de anomalías cromosómicas recurrentes, llevando posteriormente a la identificación de los genes implicados en estas alteraciones (rev. Chaganti, 2000; rev. Capello, 2000a).

En los LEZM, los estudios hasta ahora publicados demuestran que son comunes las alteraciones cromosómicas (80% de casos con un cariotipo alterado). Tanto mediante el estudio convencional del cariotipo como por hibridación genómica comparativa (CGH) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH), se ha visto que los cromosomas más frecuentemente involucrados son el 1, 3, 6, 7, 8, 12 y 14 (rev. Matutes, 2007).

Sin embargo, la alteración citogenética más comúnmente descrita hasta el momento en estos tumores (hasta un 40% de los casos) son las **pérdidas en la región 7q31-q32** (Jaffe, 2001; Swerdlow, 2008). Mediante estudios de pérdida de heterozigosidad (LOH) se ha demostrado que el 45% de los LEZM presentan pérdidas en la región 7q22-q36 y este porcentaje es significativamente superior respecto a otros linfomas B de células pequeñas (Mateo, 1999). Adicionalmente, ha sido identificada una región mínima común de delección (RMCD), de manera que se ha propuesto la presencia de algún mecanismo supresor localizado en esta zona (Mateo, 1999; Solé, 2001; Gruszka-Westwood, 2003). También se han descrito varios casos con traslocaciones que involucran a la región 7q21 viéndose afectado

el gen *CDK6* implicado en la regulación del ciclo celular.

La frecuencia de aparición de las alteraciones en 7q es seguida por las ganancias en los brazos largos de los cromosomas 3 y 12 (3q y 12q) (alrededor del 20% de los casos).

3.3.2 Hipermutación somática (*IgV_H* y *BCL6*).

Para generar la mayor diversidad de anticuerpos y reconocer al mayor repertorio de antígenos posible, durante la maduración de las células B en la médula osea se produce el **reordenamiento génico de las cadenas de las inmunoglobulinas (Ig)**. Posteriormente, como mecanismo fisiológico inductor de variabilidad adicional, se produce en los CG la **hipermutación somática** sobre el dominio variable de los genes de las cadenas de las inmunoglobulinas (***IgV_H***: cadenas pesadas e ***IgV_L***: cadenas ligeras) mediante la introducción de mutaciones puntuales y ocasionalmente deleciones y duplicaciones, con una alta frecuencia, a nivel de todo el dominio variable.

Analizando este mecanismo en linfomas de células B, podemos saber de qué población celular han derivado dichos linfomas dado que es un reflejo del grado de diferenciación de los linfocitos B en el CG (rev. Kuppers, 1999; rev. Hummel, 2000; Algara, 2002; Camacho, 2003).

Los primeros estudios en **LEZM** mostraban que todos los casos presentaban mutaciones somáticas en *IgV_H*, sugiriendo que estos tumores derivaban de células B de memoria o “post-CG” sin ningún patrón significativo de selección antigénica (Zhu, 1995; Tierens, 1999). Sin embargo, en estudios recientes se han llegado a secuenciar hasta 200 casos demostrando mutaciones somáticas en alrededor de la mitad de los casos de LEZM con preferencia del reordenamiento a nivel de la subfamilia *V_{H1-2}* del gen de las Ig tanto en los casos mutados como en los no mutados (44/184casos) (Algara, 2002; rev. Matutes, 2007).

Estos estudios indican una **heterogeneidad molecular** dentro de esta entidad ya que incluyen casos con los segmentos de *IgV_H* vírgenes propio de células “pre-CG” como una subpoblación de células B “post-CG” altamente seleccionada por antígeno por el uso preferencial de *V_{H1-2}*.

Por otro lado, aunque clásicamente el fenómeno de hipermutación somática se veía restringido a los genes de las Ig, otros estudios mostraron que el proto-oncogén **BCL6** sufre mutaciones que ocurren selectivamente en el CG tanto de células B normales como tumorales (Migliazza, 1995; Gaidano, 1997b, Pasqualucci, 1998). Varios estudios en **linfomas** han demostrado que el fenómeno de hipermutación en este gen se da paralelamente aunque con una frecuencia menor que en el gen de IgV_H (Pasqualucci, 1998; Capello 2000b). Esto sugiere que las mutaciones en ambos genes se producen a través del mismo mecanismo en el mismo compartimento celular pero con diferencias en la tasa de transcripción así como en elementos de control de este fenómeno (Shen, 1998). En los **LEZM** las mutaciones en **BCL6** aparecen sólo en un **13%** de los casos (Mateo, 2001) apoyando de nuevo la heterogeneidad molecular de esta entidad.

3.3.3 Mutaciones en P53.

El gen codificante para la proteína P53 que tiene un papel crítico en el control del ciclo celular y se ha encontrado mutado en aproximadamente la mitad de tumores humanos (rev. Stratton, 1992; Hollstein, 1996), en LBCP el porcentaje medio es menor y en el caso de los LEZM la frecuencia oscila según las series entre el **3** y el **17%** de los casos (Baldini, 1994; Gruszka-Westwood, 2001).

3.4 Diagnóstico diferencial

Se puede elaborar un correcto diagnóstico combinando el estudio del tumor en la sangre periférica, médula ósea y tejido esplénico (rev. Matutes, 2007). Sin embargo, ante la ausencia de un marcador molecular específico, este diagnóstico resulta a veces difícil frente a otros LBCP como LLC-B, FL, MCL, MALT e incluso otros síndromes linfoproliferativos B ya que pueden reproducir los cambios morfológicos propios de los LEZM.

► Linfoma MALT: Ocasionalmente, los linfomas MALT infiltran el bazo, y cuando lo hacen presentan un patrón micronodular con diferenciación marginal, que hace necesario su diagnóstico diferencial. En estos casos, rasgos útiles a favor de

LEZM es la frecuente expresión de IgD, más raramente observada en MALT y a favor de los MALT la presencia de la traslocación t(11;18) que se da en un 50% de los casos (Du, 1997). Otras características moleculares propias de los MALT que pueden ayudar al diagnóstico, son la desregulación transcripcional de *BCL10*, *MALT1* o *FOXP1* (Swerdlow, 2008).

► LF: En ellos se pueden observar los rasgos morfológicos de los LEZM como es el patrón micronodular y la diferenciación marginal en el bazo (Du, 1997; Piris, 1998). En tales circunstancias el estudio de la traslocación t(14;18)(q32;q21), que implica la desregulación de *BCL2* y que se da en la mayoría de los LF (90% de casos), permite su diagnóstico diferencial frente al LEZM (rev. Matutes, 2007).

► LCM: En estos casos también se puede observar en la médula ósea y en el bazo una morfología semejante a la descrita en el LEZM. Característica del LCM es la traslocación t(11;14) (70-75% de los casos) que implica la sobreexpresión de la proteína Ciclina D1. La presencia de estos marcadores es clave para diferenciar ambos tumores (rev. Matutes, 2007; Swerdlow, 2008).

► LLC-B: Aunque la infiltración esplénica por LLC-B suele mostrar un patrón difuso, localizado predominantemente en la pulpa roja borrando los folículos linfoides, en ocasiones muestran también un patrón micronodular con diferenciación marginal. En estos casos el inmunofenotipo CD23+, CD5+, CD43+ e IgD+, sumado a un índice de proliferación bajo sin patrón anular, favorece el diagnóstico de LLC-B (Piris, 1998). Son útiles los estudios mediante FISH ya que alrededor de un 80% de casos de LLC-B presentan alteraciones detectables mediante esta técnica: las más frecuentes son la delección de 13q14.3 (50% de casos), trisomía 12 (20% de casos) o delecciones en 11q22-23 (20% de casos) (Swerdlow, 2008).

► LPL: El diagnóstico diferencial con LPL puede resultar problemático dado que los LEZM pueden presentar diferenciación plasmacítica con paraproteína sérica clonal al igual que los LPL (Van Huyen, 2000) y además, al igual que los LEZM, tampoco presentan una alteración cromosómica o molecular característica como ocurre con otros LBCP. Un patrón de infiltración mixto, en pulpa blanca y roja, con agregados periarteriolares de linfocitos pequeños, células plasmocitoides e

inmunoblastos, junto con ausencia de diferenciación marginal, apuntan hacia el diagnóstico de LPL (rev. Mollejo, 2005).

3.5 Tratamiento.

Actualmente se suelen dividir a los pacientes en **dos grupos** según su sintomatología al diagnóstico (rev. Matutes 2007):

- **LEZM temprano o asintomático.**
- **LEZM tardío o sintomático.** (Síntomas debidos a esplenomegalia y citopenias)

- Para el primer grupo de pacientes con “**LEZM temprano o asintomático**” el protocolo terapéutico recomendado es el de “**observar y esperar**”. Existen datos recogidos de amplias series de pacientes en las que se demuestra que aquellos pacientes que no han requerido tratamiento al diagnóstico presentan un curso clínico favorable (Chacón, 2002; Thieblemont, 2002).

- Para los casos que presentan un “**LEZM tardío o sintomático**” el tratamiento de elección es la **esplenectomía**. Se ha descrito buena respuesta con reducción de las citopenias.

Sin embargo, hay ocasiones en que la cirugía está contraindicada o ha habido progresión clínica tras la esplenectomía. En estos casos se proponen protocolos opcionales de tratamiento:

- **Radioterapia.**
- **Quimioterapia:**
 - Agentes alquilantes (Clorambucil o Ciclofosfamida)
 - Análogos de purina (Fludarabina)
- **Rituximab:** Terapia basada en un anticuerpo monoclonal frente a linfocitos B anómalos utilizado en otros linfomas B.

Puede ser utilizado en LEZM en asociación con una terapia convencional (Fujita, 2003; Arcaini, 2004)

- Adicionalmente cabe destacar el uso satisfactorio en pacientes LEZM VHC-positivos de terapias anti-virales como el α -interferon y la rivabirina. Este hallazgo es análogo a la ampliamente utilizada terapia de erradicación de *Helicobacter pylori* como tratamiento de los linfomas MALT gástricos (Hermine, 2002; Saadoun, 2005).

3.6 Factores pronósticos.

Los estudios realizados con series grandes de pacientes establecen que los factores pronósticos clínicos adversos derivan de gran masa tumoral y pobre estado general del paciente al diagnóstico. Algunas de las variables consideradas como factores clínicos pronósticos son los niveles reducidos en sangre de hemoglobina y albúmina, niveles aumentados de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y $\beta 2$ microglobulina, presencia de pico monoclonal, altas cifras de leucocitosis y de linfocitosis. También el desarrollo de adenopatías y la infiltración tumoral en otras localizaciones no hematopoyéticas tienen valor pronóstico (rev. Matutes, 2007).

Diversos estudios moleculares han llevado además a la identificación de ciertos factores biológicos asociados con un peor pronóstico como:

- **presencia de mutaciones en el gen *P53*** (Camacho, 2001)
- **delección de 7q** (Mateo, 1999)
- **ausencia de mutaciones somáticas en *IgV_H*** (Algara, 2002; rev. Mollejo, 2005).

Es fundamental, ampliar el conocimiento sobre nuevos marcadores con valor pronóstico, necesarios para mejorar la estratificación de los pacientes en distintos grupos de riesgo y/o para dirigirlos a protocolos específicos de tratamiento.

4 Análisis del perfil de expresión génica con micromatrices en cáncer.

La secuenciación completa del genoma humano (Lander, 2001) ha supuesto un cambio trascendental en la manera de entender, investigar y abordar anomalías moleculares que dan lugar a disfunciones celulares que implican graves enfermedades como puede ser el cáncer.

La base molecular del comportamiento de las células cancerígenas ha sido clásicamente asignada a la alteración por distintas vías de **oncogenes** y **genes supresores de tumores**. Sin embargo, los avances en la investigación de aspectos básicos de la biología celular han transformado el entendimiento de los mecanismos implicados en cáncer.

La mayoría de mecanismos fisiológicos de control dentro de la célula contienen tanto vías inhibitorias (función análoga a los supresores de tumores) como estimuladoras (función análoga a los oncogenes). En términos de función, lo importante no es distinguir entre oncogenes y supresores de tumores, sino entre genes que forman parte de las distintas rutas bioquímicas y reguladoras, que pueden estar unidos mediante complejas vías interdependientes (Alberts, 2006).

Así, diversos estudios han demostrado que las rutas de señalización básicas dentro de la biología celular normal como son: el control del ciclo celular, la muerte celular programada o apoptosis, el control de movimiento o la comunicación intercelular, forman parte de las **funciones claves en cáncer** adquiridas por las células malignas (rev. Hanahan y Weinberg, 2000). Estas funciones son:

- Autosuficiencia en señales a favor de la división celular.
- Insensibilidad a señales anti-proliferación.
- Evasión de apoptosis.
- Potencial de replicación ilimitado.
- Angiogénesis mantenida.
- Invasión de tejido o metástasis.

Desde mediados de los años noventa existe una potente técnica de análisis genómico de expresión como son las **micromatrices de ADN** que bien pueden ser

diseñadas con ADN codificante (ADNc) (ADN monocatenario y complementario al ARN mensajero que contiene la secuencia codificante de un gen) o bien con secuencias cortas de nucleótidos (oligonucleótidos), que permiten el análisis de la expresión de miles de genes simultáneamente (De Risi, 1996; Gerhold, 1999). Las micromatrices, también conocidas como *microarrays* o *biochips* consisten en soportes físicos (como un portaobjetos de cristal) en los cuales se imprimen de forma organizada los fragmentos de ADN correspondientes a miles de genes. Cada punto en la matriz corresponde con un gen específico y definido. (Figura 4)

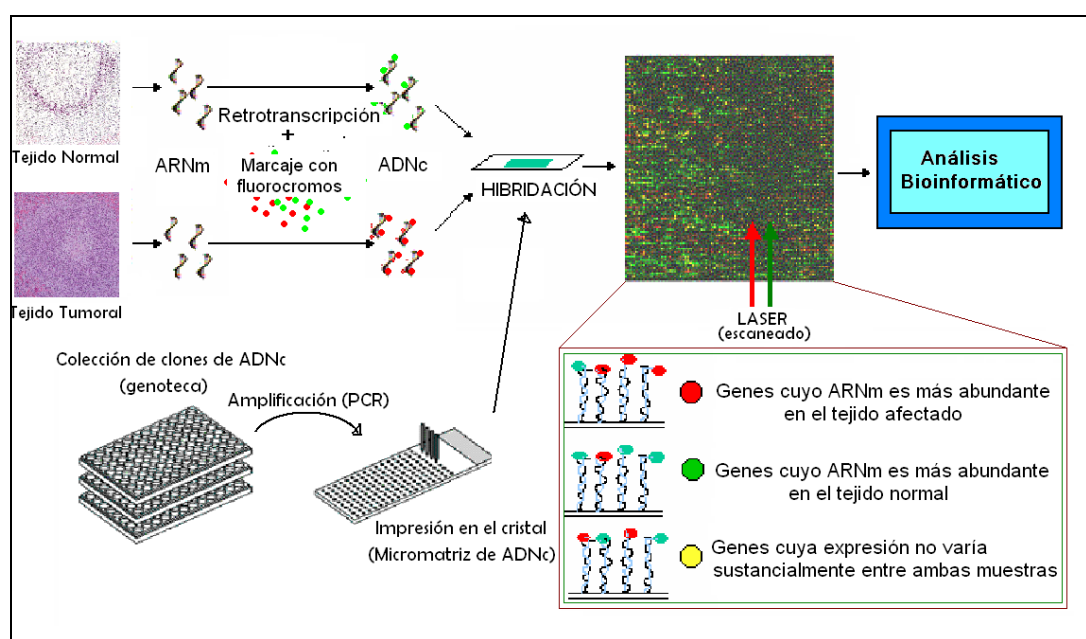


Figura 4. Esquema representativo de un ejemplo de micromatriz de ADNc. El esquema representa tanto su fabricación como la obtención, el marcaje (en este caso mediante fluorescencia) e hibridación del ARN mensajero (ARNm) obtenido a partir de las muestras a analizar. (Modificada de Duggan *et al. Nature Genetics*, 1999)

Los análisis de expresión génica masiva permiten la identificación de los genes desregulados (sobreexpresados o reprimidos) en cada tipo tumoral como candidatos para conocer las bases moleculares del proceso neoplásico, los cuales tras validaciones posteriores de su funcionalidad, pueden suponer avances en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

Una primera aproximación en este tipo de estudios suele ser la agrupación o *clustering* jerárquico de genes involucrados en funciones similares o de muestras

que compartan ciertas condiciones (Eisen, 1998). De esta forma, se han podido mejorar las clasificaciones moleculares de las neoplasias, identificando nuevos tipos o subtipos dentro de cada una de las entidades propuestas (Yeang, 2001).

Con estas herramientas no sólo se han podido distinguir subtipos tumorales entre sí, sino que también se ha conseguido, con una altísima tasa de éxito (hasta del 90%), clasificar los tejidos como tumorales o como sanos por diferencias en la expresión de grupos de genes concretos. (Ben-Dor, 2000).

4.1 Estudios con micromatrices de ADN en Linfomas

La utilización de estas técnicas resulta especialmente interesante en el estudio de las neoplasias linfoides.

Diferentes clasificaciones de linfomas han supuesto históricamente una fuente de controversia. En otoño del año 1994 la revista *Blood* publicó la clasificación *REAL* de Linfomas propuesta por el Grupo de Estudio Internacional de Linfomas, un grupo de expertos en linfomas de Europa, Estados Unidos y Asia (Harris, 1994). Esta clasificación está basada en información clínica, morfológica, fenotípica y molecular y su aceptación se ha facilitado por diversos estudios que demuestran su reproducibilidad.

Pero los análisis de series amplias de pacientes han demostrado que cada tipo mayor de linfoma definido en la REAL, presenta una heterogeneidad clínica con respuestas a los tratamientos y factores pronósticos diferentes.

Posteriormente, la Clasificación de la OMS incluyó los datos moleculares y genéticos identificados hasta el momento (Jaffe, 2001; Swerdlow, 2008). La integración de estos datos permitió validar muchas de las entidades propuestas así como matizar algunos aspectos, reconociendo también el valor práctico y potencial de marcadores moleculares para predecir la conducta clínica y respuesta al tratamiento de las neoplasias hematológicas.

Así, los primeros estudios con micromatrices de ADNc en neoplasias linfoides han permitido mediante el estudio de los perfiles de expresión génica agrupar y diferenciar entidades tumorales como la **leucemia linfoblástica aguda (LLA)** y la **leucemia mieloide aguda (LMA)** (Golub, 1999) independientemente de un conocimiento biológico previo.

Posteriormente se realizó un estudio del perfil de expresión génica en linfomas B de alto grado: el **linfoma B de célula grande difuso (LBCGD)**, el subtipo más común dentro de los linfomas no Hodgkin (LNH). En estos tumores también existe la heterogeneidad clínica referida anteriormente. El 40% de los pacientes responden bien al tratamiento mientras que el resto sucumben a la enfermedad. Los resultados de este estudio demuestran que existen dos formas tumorales molecularmente distintas que reflejan diferentes estados en la diferenciación de las células B. Así un tipo de tumor expresaba genes característicos del centro germinal de células B con un curso más indolente de la enfermedad, mientras que el segundo tipo tumoral comprendía genes típicamente expresados en células B activadas. En este trabajo se consiguió elaborar un modelo predictivo de manera que podían clasificarse los tumores como agresivos basándose en su patrón de expresión génica (Alizadeh, 2000).

Adicionalmente, a partir de un modelo predictivo, se identificó un tercer subgrupo de genes con valor pronóstico tras el tratamiento con quimioterapia, de manera totalmente independiente de los factores pronósticos conocidos y consensuados (Rosenwald, 2002).

4.1.1 Estudios con micromatrices de ADN en LBCP:

También existen trabajos para la mayoría de entidades que componen el grupo de los **LBCP**:

- En los **LF**, se han podido identificar 24 genes sobreexpresados y 8 reprimidos en el tumor que definen la firma molecular de este tipo de linfoma y que están relacionados con el desarrollo normal de la célula B así como otros involucrados en la comunicación inter-celular. Estos hallazgos permiten profundizar en la patogénesis del tumor y según apuntan los autores de este trabajo, podrían conducir a la identificación de posibles dianas terapéuticas revelando antígenos

para potenciales estrategias inmunoterápicas (Husson, 2002). Posteriormente, se publicó un trabajo en el que se identificó un subgrupo de 81 genes cuyo perfil de expresión era capaz de clasificar los pacientes de LF como de bajo o alto grado. Tras su validación en series independientes de casos, se pudo concluir que la tasa de acierto en esta estratificación era mucho más alta que usando los criterios clínicos e histológicos utilizados hasta el momento (Glas, 2005).

- También se ha estudiado el perfil molecular de los **LCM** mediante micromatrices de ADNc. Los datos obtenidos se correlacionaron con las distintas variantes moleculares, inmunohistológicas y patológicas que caracterizan a este tipo de tumor. Una característica fundamental de esta entidad es la fuerte resistencia al tratamiento que no se correlacionaba sin embargo con las alteraciones moleculares descritas hasta ese momento. A partir de los resultados de estos estudios de micromatrices se observó que se trata de una entidad molecular única ya que presenta un perfil de expresión génica muy homogéneo y que dentro de su firma se encuentran desregulados genes implicados en transducción de señales, ciclo celular, resistencia al tratamiento y apoptosis, especialmente en la ruta del factor de necrosis tumoral (TNF) e implicados en la activación del factor de transcripción NF- κ B. Así mismo, se encontraron sub-grupos de genes cuya expresión permitía estratificar a los pacientes en dos grupos según su probabilidad de supervivencia (Martínez, 2003; Rosenwald, 2003).

- Igualmente, se han realizado este tipo de estudios en **LLC-B**, otro linfoma de bajo grado pero con un curso clínico ciertamente heterogéneo. Desde el punto de vista molecular, se han identificado algunas variables involucradas en su patogénesis y comportamiento como la presencia de diversas alteraciones cromosómicas, estado mutacional en el gen *IgV_H* y expresión de la proteína ZAP-70 (Stilgenbauer, 1998). Su variabilidad clínica y la ausencia hasta la fecha de una terapia curativa eficaz, estimulan la búsqueda de factores pronósticos que permitan estratificar estos pacientes y asignarlos a diferentes protocolos de tratamiento. Para ello es útil el análisis de la expresión génica que revela la presencia de dos subgrupos de pacientes con distinta probabilidad de supervivencia que se dividen por el grado de activación de NF- κ B, determinada mediante la expresión de su marcador proteínico I κ B α fosforilado. La activación de NF- κ B, venía acompañada de

la expresión diferencial de genes diferencialmente entre ambos grupos, todos ellos implicados en la señalización a partir del receptor de la célula B (BCR), transducción celular y apoptosis (Rosenwald, 2003; Rodríguez, 2004)

- Finalmente, en los **LEZM**, en el año 2004 de forma paralela a la elaboración de uno de los estudios recogidos en la presente tesis (**ARTÍCULO 1**), se publicaron dos artículos que recogían algunos datos en series pequeñas, obtenidos mediante micromatrices de ADN en LEZM. Por un lado, el trabajo de Tröen, donde el principal hallazgo fue la sobreexpresión del factor de transcripción **NOTCH2**, que induce diferenciación marginal en células B. Y por otro, el de Thieblemont en 2004, que comparaba los perfiles de expresión de series reducidas de casos para cada una de las entidades que componen el conjunto de los LBCP, contribuyendo al avance en el conocimiento de su patogénesis diferencial. Thieblemont propuso que los **LEZM** se distinguían de otros LZM por la sobre-expresión de la proteína anti-apoptótica **AKT1**.

4.1.2 Implicación de las vías de señalización dependientes de NF- κ B.

Los distintos análisis moleculares con micromatrices sobre varios tipos de linfoma encontrados en la literatura, presentan resultados que apuntan a la **activación de NF- κ B** como un fenómeno común en todos los procesos de linfomagénesis (Karin, 2002).

El complejo proteínico NF- κ B constituye un factor regulador transcripcional de más de 60 genes conocidos que participa de manera fisiológica en las **respuestas inflamatorias** y durante la **diferenciación celular** y el **desarrollo**.

Existen **5 subunidades** proteínicas en mamíferos miembros de la familia REL/NF- κ B:

- **P50 (NF- κ B1)**
- **P52 (NF- κ B2)**
- **P65 (RELA)**
- **RELB**
- **C-REL**

Todas ellas forman una variedad de homo- o heterodímeros, cada uno de los cuáles activa su propio y característico grupo de genes (Alberts,2006).

NF-kB permanece inactivo dentro de grandes complejos proteínicos en el citoplasma debido a la unión de unas proteínas inhibitorias denominadas IκB. Tras el estímulo activador correspondiente, se desencadenan una serie de vías de señalización que llevan a la fosforilación y consecuente degradación de las IκB. La degradación de las IκB expone a las proteínas NF-kB a señales de localización nuclear lo que provoca que se transporte al núcleo y estimule específicamente la transcripción de ciertos genes.

NF-kB es capaz de desencadenar vías de señalización a favor de la supervivencia celular tras la activación de la quinasa AKT también denominada proteína quinasa B (PKB), que a su vez forma parte de la **ruta anti-apoptótica denominada PI3K (Fosfoinositol-3-quinasa)/AKT**.

Un estudio con micromatrices que comprende alrededor de 300 **LNH** demostró que la activación de NF-kB es un fenómeno común dentro de los LHN y que dependiendo del contexto celular contienen posibles dianas diferentes de NF-kB. Los genes que codifican para **proteínas antiapoptóticas: BCL2 y SURVIVINA (BIRC5)** se identifican como dianas fundamentales de este factor de transcripción y son capaces de distinguir entre LBCP y linfomas agresivos (LBCGD) (Tracey, 2005).

4.2 Validación.

Parecen evidentes los avances que pueden conseguirse gracias a esta herramienta relativamente nueva. Sin embargo, la potencia que nos ofrece implica nuevos retos en lo que se refiere al análisis estadístico dado que los datos que se generan con micromatrices, tienen un gran volumen de variables frente a un número de casos pequeño (Tilstone, 2003).

Así, los resultados generados con micromatrices conllevan en mayor o menor grado carencias en su reproducibilidad cuando son aplicados en un contexto distinto; es decir, en otros centros, por otros especialistas, o usando una tecnología diferente (Larkin, 2005; Michiels, 2005).

Por tanto, a la hora de abordar este tipo de estudios, será básica la utilización de otras técnicas que permitan confirmar los resultados derivados de estos análisis.

4.2.1 PCR cuantitativa a tiempo real

Una herramienta de particular interés que se usa de forma muy extendida para resolver los problemas que suelen plantear estos estudios es la **PCR cuantitativa a tiempo real**. Esta técnica aprovecha el fenómeno de fluorescencia para medir la cantidad de producto de PCR a tiempo real. El momento (ciclo) en el que una muestra empieza a ser detectada se denomina ciclo umbral o Ct, y es proporcional a la cantidad de molde de partida. El termociclador que se utiliza está acoplado a un láser y un detector que registran el aumento de fluorescencia en el tubo. Los dos tipos de reactivos fluorescentes más extendidos son los “agentes intercalantes” y las “sondas *TaqMan*”. Aunque sobre un número menor de genes, esta técnica permite investigar y validar los marcadores obtenidos mediante micromatrices en un número más limitado, pero con una gran reproducibilidad y alta sensibilidad (Rajeevan, 2001).

4.2.2 Matrices de tejido o TMA.

Por otro lado, las **matrices de tejido o *tissue microarray* (TMA)** permiten validar los resultados de expresión con micromatrices de ADNc, a nivel proteínico, de manera rápida y eficiente en un gran número de muestras. Consiste en la construcción de un bloque de parafina en el que se incluyen cilindros de muestras representativas de múltiples casos en estudio. Posteriormente, tras la tinción por inmunohistoquímica de los cortes obtenidos a partir de este bloque, se puede

analizar la expresión proteínica de diferentes marcadores en múltiples casos a la vez, incluidos en una sola preparación.

Se pueden utilizar como control de calidad para aquellos genes candidatos obtenidos a partir de los análisis de expresión. De esta manera se han podido evaluar biomarcadores con éxito en distintas aplicaciones clínico-patológicas (Watanabe, 2005).

5 MicroRNAs.

Otras alteraciones moleculares, genéticas o epigenéticas, como son las que involucran a los microRNAs (miRNAs), están pendientes de ser exploradas en lo relativo a su relevancia, clínica o biológica, en tipos tumorales concretos como es el LEZM.

5.1 Definición

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA de cadena sencilla contenidas en el genoma de animales y plantas. Se trata de secuencias pequeñas (alrededor de 20 p.b.), no codificantes, que regulan la expresión de genes de manera específica uniéndose mayoritariamente al extremo 3' no codificante (UTR) del RNA mensajero (ARNm) e implicando generalmente una regulación negativa en sus correspondientes productos proteínicos.

Hasta el momento actual se han encontrado unas 700 secuencias de posibles miRNAs maduros en *homo sapiens*, propuestas bien por secuenciación, protocolos bioinformáticos u homología con otras especies. Todas ellas se encuentran registradas en la base de datos del Instituto Sanger (<http://microrna.sanger.ac.uk/>).

Las secuencias precursoras de estas moléculas se encuentran distribuidas en el genoma en áreas no relacionadas con genes conocidos, y sufren un complejo procesamiento proteínico hasta llegar a su forma madura y activa (Figura 5):

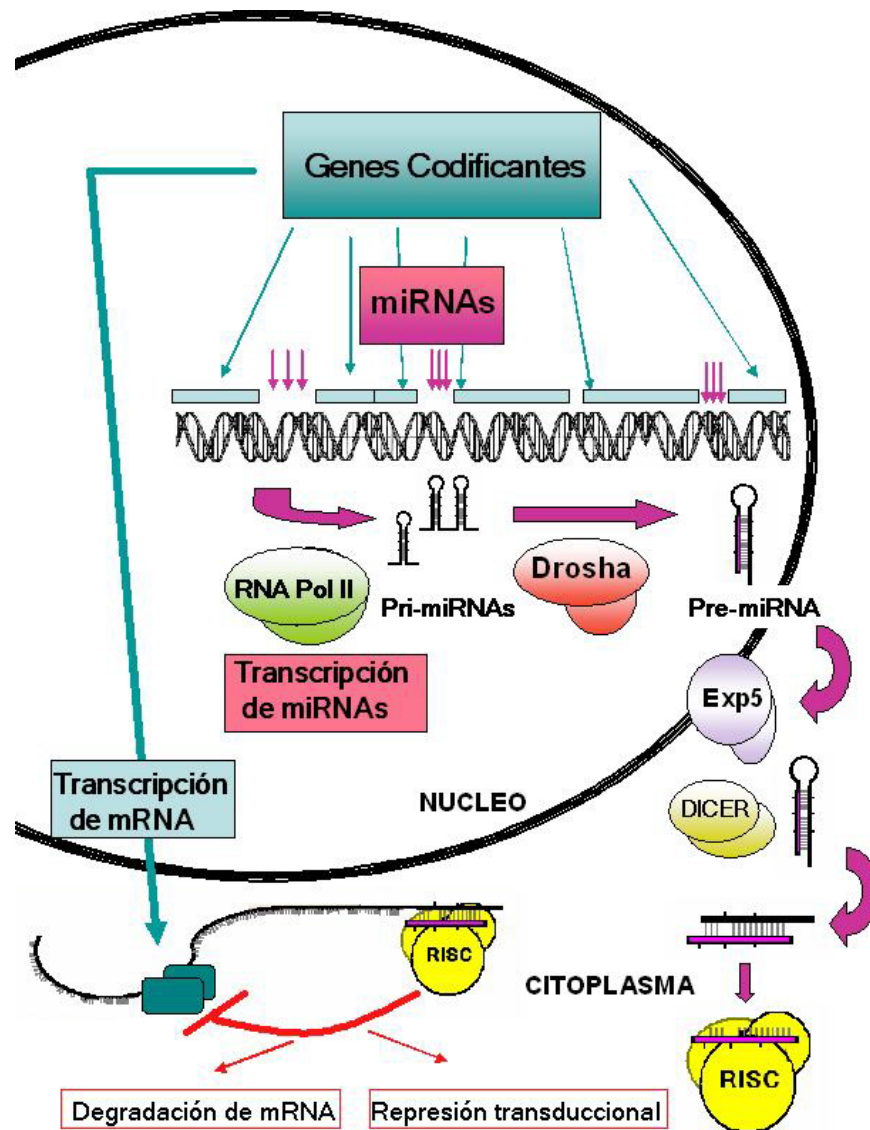


Figura 5. Esquema representativo del procesamiento de un miRNA.

Inicialmente se transcriben mediante la **RNA polimerasa II** (Smalheiser, 2003; Cai, 2004) como **pri-miRNAs** (Lee, 2002). Posteriormente la ribonucleasa **DROSHA** escinde el pri-miRNA para liberar en el núcleo estructuras en horquilla de 70 nucleótidos aproximadamente que son los denominados **pre-miRNA** (Lee, 2003). Estos pre-miRNA son seleccionados y exportados por la exportina 5 (**EXP5**) al citoplasma donde la ribonucleasa **DICER** corta las estructuras de RNA de doble cadena que darán lugar mediante selección de la hebra funcional por parte de la encima **RISC** al fragmento de 20 p.b. aproximadamente que conforman los miRNAs ya maduros (Lee 2003, Lund 2003, Yi 2003).

El primer miRNA se describió hace más de una década (Lee, 1993), pero ha sido en los últimos años cuando se está teniendo en cuenta la importancia, diversidad y potencial regulador de estas moléculas. Cada miRNA es capaz de regular múltiples genes así como múltiples miRNAs pueden estar regulando la expresión de una misma diana. Desde el punto de vista funcional, algunas estimaciones arrojaban la cifra de hasta 200-300 miRNAs únicos y funcionales en el genoma de los grandes eucariotas (Lim 2003b), sin embargo, estudios más recientes apuntan hasta un número de 800 de estas moléculas sólo en humanos (Bentwich, 2005).

Diversos grupos de investigación han mostrado evidencias de que estas moléculas pueden actuar de manera clave en procesos como el desarrollo embrionario (Reinhart 2000), proliferación y muerte celular (Brennecke 2003), apoptosis y metabolismo (Xu, 2003) o diferenciación celular (Dostie 2003, Chen 2003).

5.2 Implicación en Cáncer

Dada la capacidad reguladora de los miRNA y las amplias investigaciones sobre diversos tipos tumorales en los últimos años, se han podido proponer estas moléculas como participantes en la oncogénesis debido a que pueden funcionar como genes supresores de tumores o como oncogenes en diversos tipos de tumores humanos.

Con estudios mediante diversas plataformas de micromatrices, se ha podido demostrar que su perfil de expresión se encuentra alterado en el cáncer humano, tanto en tumores sólidos como en tumores de origen hematopoyético (Rev. Calin 2006; Zhang, 2006). Diferencias en su perfil de expresión se han podido relacionar también con las características biológicas o clínicas de estos tumores como pueden ser el tipo de tejido de origen, diferenciación, agresividad o respuesta al tratamiento (Rev. Calin 2006).

Se ha demostrado que ciertos genes involucrados en la oncogénesis son diana para los miRNAs con expresión alterada. Así la familia de oncogenes Ras se

veía regulada por miRNAs miembros de la familia *let-7* en cáncer de colon (Akao, 2006), el gen para la proteína anti-apoptótica *BCL2* por *miR-15a* y *miR-16-1* en LLC-B (Cimmino, 2005), el factor de transcripción *E2F1* por el *miR17-92* o *BCL6* por *miR-127*. (rev. Calin, 2006).

5.3 miRNAs en Linfomas

Los primeros miRNAs que se relacionaron con la oncogénesis humana fueron descritos en LLC-B. Los miRNAs *miR15* y *miR16*, localizados en 13q14, una región perdida en más de la mitad de los casos de este tipo de LBCP, se encontraban deletados o reprimidos en la mayoría de casos de LLC-B analizados (Calin, 2002). Posteriormente, se demostró en líneas celulares de LLC-B transfectadas con *miR15* y *miR16* que ambos regulaban negativamente la expresión de *BCL2* a nivel post-transcripcional y por tanto eran capaces de inducir apoptosis (Cimmino, 2005). Estos miRNAs al verse reprimidos bien por delección, mutación o metilación, implicaban sobre-expresión de *BCL2*, proteína anti-apoptótica clave también en la oncogénesis de otros tipos de tumores hematopoyéticos.

Recientemente, se ha demostrado a nivel funcional la regulación por parte de *miR-29* y *miR-181* sobre el oncogen *TCL1A* en líneas celulares de LLC-B (Pekarsky, 2006).

Al igual que en otros tipos tumorales, los perfiles de expresión de estas relativamente nuevas moléculas son característicos de diversos tipos de neoplasias linfoides, no sólo en LLC-B. En líneas celulares humanas de varios tipos de tumores hematopoyéticos también se puede observar su expresión diferencial frente a células no tumorales (Ramkissoon, 2006).

5.3.1 miRNAs localizados en 7q

Las secuencias precursoras que dan lugar a los miRNAs humanos se ha visto que se localizan preferencialmente en sitios frágiles (regiones del genoma que sufren con frecuencia alteraciones cromosómicas), muchos de los cuales se han visto frecuentemente implicados en distintos tipos de cáncer (Calin, 2004) (Figura 6).

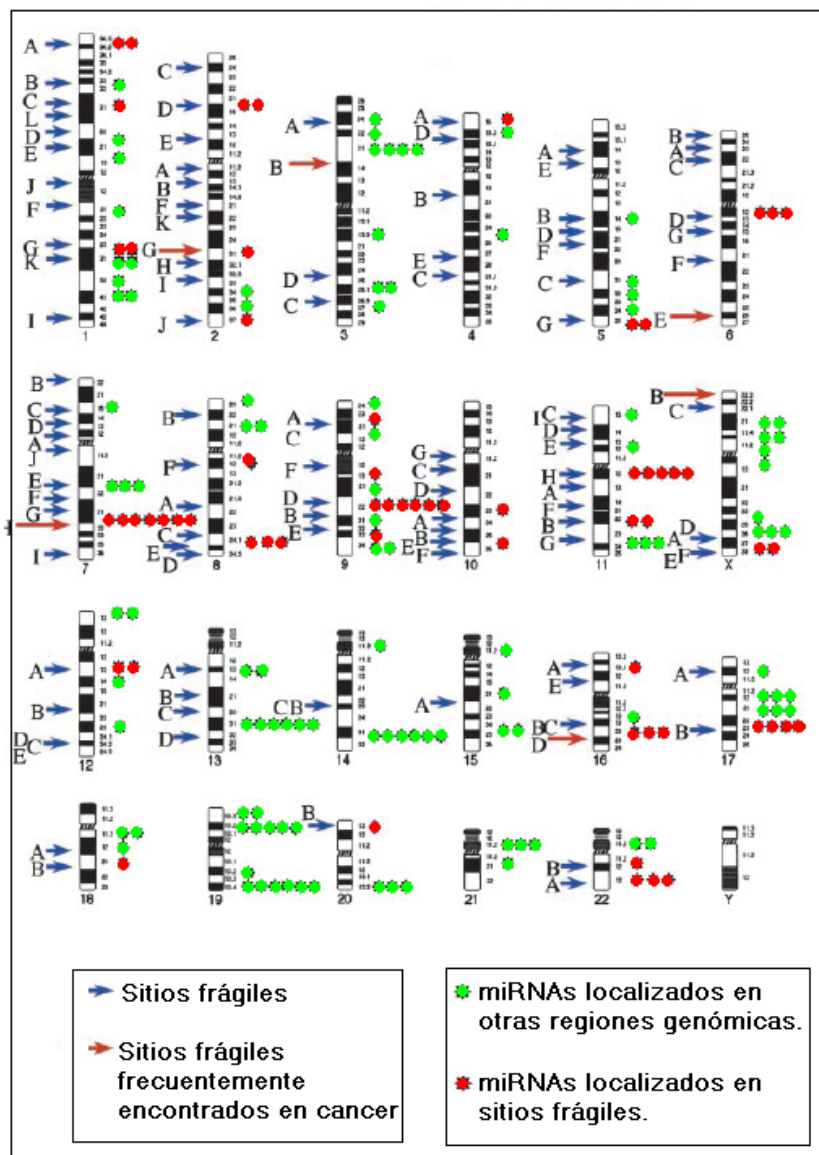


Figura 6. Localización cromosómica de los miRNAs humanos. El presente ideograma muestra la localización cromosómica de 113 sitios frágiles y 186 miRNAs. (Modificada de Calin *et al.* PNAS, 2004)

En los LEZM la alteración cromosómica más frecuente encontrada hasta el momento eran las pérdidas en 7q. Teniendo en cuenta la información de las localizaciones de los miRNAs obtenida a partir de las bases de datos del Instituto Sanger y del *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) (www.ebi.ac.uk/embl/), dentro de la RMCD de 7q31-32 en los LEZM descrita hasta el momento (Gruszka-Westwood, 2003), se encuentran una alta densidad de estas secuencias, un total de **9 miRNAs** agrupados en esta región y representada en la Figura 7.

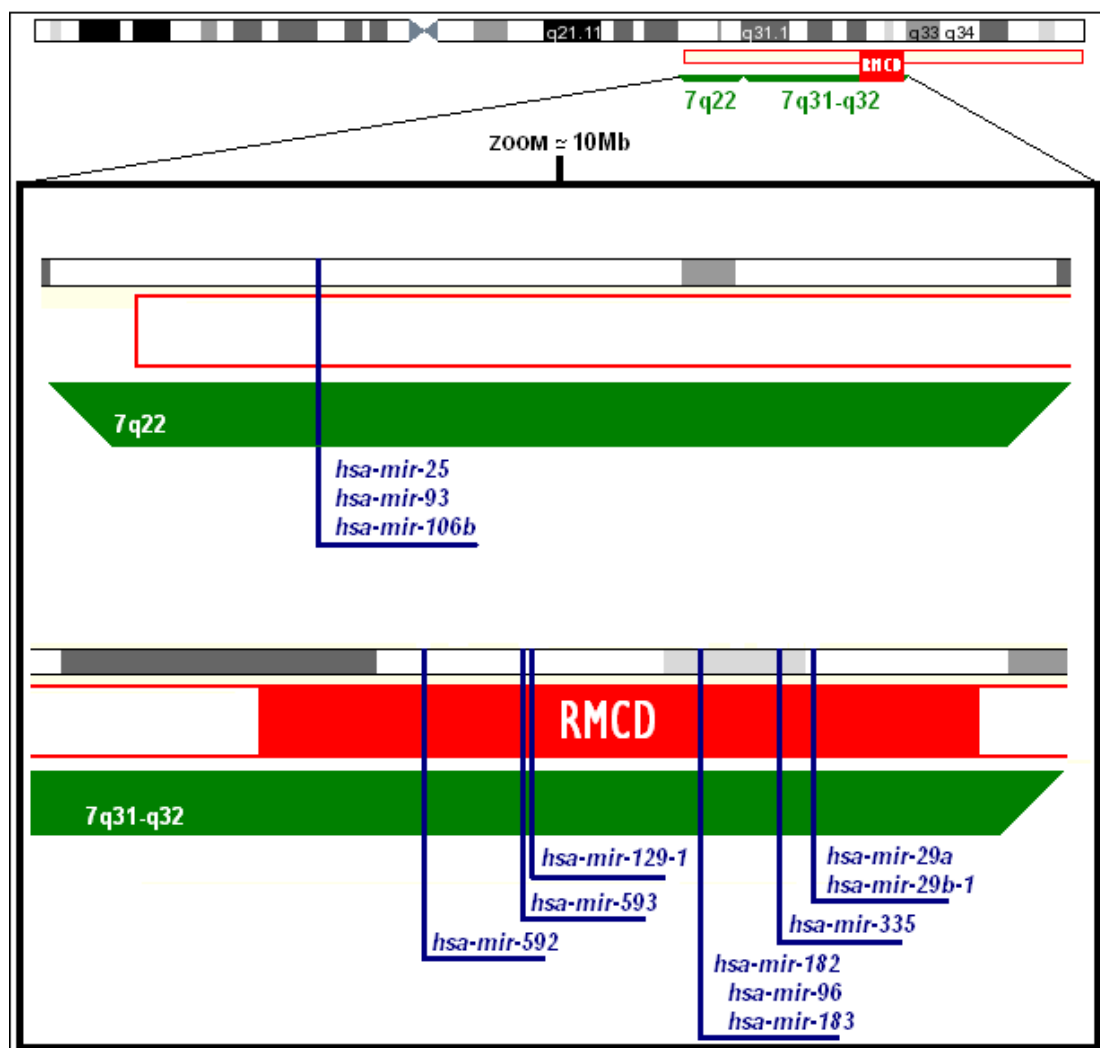


Figura 7. miRNAs localizados en 7q. Se presentan las regiones cromosómicas de 7q más frecuentemente alteradas en los LEZM, incluyendo la RMCD.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

Ante la ausencia de marcadores moleculares propios de los LEZM, su diagnóstico en ocasiones presenta dificultades en cuanto a precisión y reproducibilidad. Incluso cuando el diagnóstico es el correcto, el curso clínico puede ser variable entre pacientes y los factores pronósticos conocidos no son suficientes para estratificarlos en distintos grupos de riesgo que permitan la selección de protocolos específicos de tratamiento. (Mollejo, 1995; Chacon, 2002; Thieblemont, 2003).

Por lo tanto, bajo la hipótesis general de que la ampliación de estudios moleculares y su integración con parámetros clínicos en los LEZM proporcionarán un aumento en el conocimiento del proceso neoplásico con la consecuente mejora en su diagnóstico, pronóstico y tratamiento, los objetivos planteados fueron los siguientes:

- 1º) Estudiar el **perfil de expresión génica** en los LEZM.
- 2º) Revelar **alteraciones moleculares específicas** en los LEZM con valor diagnóstico.
- 3º) Identificar nuevas moléculas útiles para **mejorar su diagnóstico diferencial** frente a otros LBCP.
- 4º) Describir **nuevos marcadores con valor pronóstico**, relacionando el perfil de expresión con parámetros clínicos o biológicos conocidos.
- 5º) Describir **potenciales dianas de actuación terapéutica** de manera más específica.
- 6º) Identificar posibles **genes supresores** probablemente localizados en la zona frecuentemente perdida **7q31-32**, siendo ésta la alteración molecular más frecuente encontrada hasta el momento en este tipo de tumores.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1 Casos incluidos en el estudio:

- El estudio comprende una serie de **109 piezas de esplenectomía de casos diagnosticados de LEZM** de los cuales se utilizaron:

- 109 bloques de tejido incluido en parafina procedente de piezas de esplenectomía.
- 44 muestras congeladas de las piezas de esplenectomía, de los que se han realizado los estudios moleculares de esta tesis.
- 3 bloques de tejido incluido en parafina de ganglios linfáticos del hilio esplénico.

- Con fines comparativos se han incluido en la presente tesis **7 piezas de esplenectomía** infiltradas por linfomas B de bajo grado **no-LEZM**:

- 7 muestras congeladas de las piezas de esplenectomía (4 LLC-B, 2 MCL y 1 FL).

- Por otro lado, se incluyeron **70 casos** de linfomas B de bajo grado **no-LEZM (20 LLC-B, 38 MCL y 12 FL)** de los cuales se disponía de datos derivados de estudios con micromatrices (Martínez, 2003; Rodríguez, 2004) obtenidos a partir de 70 muestras congeladas de biopsias de ganglios linfáticos.

- Y finalmente, se utilizaron **6 piezas de esplenectomía no tumorales como control: 4 tras rotura post-traumática esplénica y 2 diagnosticados de púrpura trombocitopénica idiopática (PTI)**, con los siguientes tipos de muestra utilizados:

- 6 bloques de tejido incluido en parafina de las piezas de esplenectomía.
- 6 muestras congeladas de las piezas de esplenectomía.
- 1 muestra de material esplénico en fresco dentro de las 24 horas posteriores a la esplenectomía.

Todas fueron seleccionadas a partir de casos de rutina y consulta del Hospital Virgen de la Salud (HVS) de Toledo, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid y de la Red Española de Banco de Tumores.

El diagnóstico de toda la serie se hizo en base a los criterios morfológicos, inmunofenotípicos y moleculares fijados por la clasificación actual de la organización Mundial de la Salud (OMS) y fue revisado por los anatomopatólogos, directores de esta tesis: Dr. Miguel Angel Piris (MA) y Dra. Manuela Mollejo (MM).

Así mismo las historias clínicas de toda la serie fueron revisadas para determinar los parámetros clínicos de interés (edad, sexo, localización del tumor al diagnóstico, estadio clínico de la enfermedad) y datos de seguimiento clínico incluyendo supervivencia global (SG), supervivencia libre de progresión (SLP) y evolución.

2 Metodología:

Las principales técnicas y métodos utilizados en los diferentes estudios son descritos a continuación:

2.1 Micromatrices de ADNc:

Se analizaron los patrones de expresión mediante la cuantificación de los niveles de ARN mensajeros (ARNm) de 27 casos de LEZM y de 5 tejidos reactivos (controles). Así mismo, con propósito comparativo, se incluyeron en el análisis los datos generados a partir de micromatrices de la misma plataforma de otros 70 casos de LBCP (20 LLC-B, 38 MCL y 12 FL) (Martínez, 2003; Rodríguez, 2004).

Para todos los casos se utilizó como plataforma el denominado ***Oncochip***

del CNIO cuya versión se describía en el artículo de Tracey *et al.* en 2002. Brevemente, el *oncochip* del CNIO es una micromatriz de ADNc orientada a la búsqueda de genes implicados en cáncer. Esta versión contenía fragmentos o sondas de ADNc, procedentes de clones correspondientes a más de 7000 genes impresos por duplicado en un soporte de vidrio de 25x75mm². Entre estos genes, se encontraban 2489 genes conocidos por su relevante función en cáncer, otros específicos de tejido y otros elegidos como genes de control.

2.1.1 Obtención de ARN: La extracción de ARN total se realizó a partir de 32 secciones de tejido esplénico congelado (27 casos de LEZM y 5 controles) utilizando primeramente Trizol (*Life Technologies*) y después las columnas de purificación *RNeasy* (*Qiagen*). La calidad del ARN obtenido se analizó mediante geles de agarosa y se midió su concentración con el espectrofotómetro. Los casos que no presentaron suficiente integridad y pureza de ARN tuvieron que ser eliminados de este análisis. A partir de 4µg de ARN de buena calidad, se sintetizó el ADNc complementario de doble cadena con el *kit* de síntesis de ADNc *Superscript System* (*Gibco/Invitrogen*), utilizando como oligo cebador el oligodT-promotor de T7 (*Promega*). Posteriormente, se amplificaron los distintos mensajeros mediante el *kit* de transcripción *Megascript* de T7 (*Ambion*) y de igual manera que el ARN total, el ARNm amplificado fue visualizado en geles de agarosa para testar su calidad. Aquellos casos en los que no tenía calidad suficiente, fueron descartados para este tipo de experimentos.

2.1.2 Marcaje: El marcaje en dos canales con fluorocromos se realizó mediante transcripción inversa a partir de 2,5 µg del ARNm amplificado con Cy5-dUTP (verde) si procedía de alguna de las muestras problema o con Cy3-dUTP (rojo) si se trataba de la muestra de ARN de referencia, el *Universal Human Reference RNA* (*Stratagene*), un conjunto de mensajeros extraídos de líneas celulares humanas.

2.1.3 Hibridación: Previamente, los cristales fueron preparados sumergiéndolos en una solución de SDS al 0.1% durante 10 min. a temperatura ambiente en agitación, después 2 min. en agua hirviendo y finalmente

introducidos en la solución de prehibridación (4X SSC, 0.1mg/ml BSA, 0.1%SDS) durante 45 min. a 65°C. A continuación, tras lavar los cristales con agua y secarlos, se depositaban las muestras con el ADNc marcado y previamente desnaturalizado de la manera más homogénea posible sobre la cara impresa de cada uno de los cristales. La hibridación se realizó a 55°C durante 15-20 horas, en condiciones de humedad. Tras varios lavados con soluciones tampón de menor a mayor astringencia (Tampón 1: 2XSSC, 0.5%SDS a 55°C; Tampón 2: 0.5SSC, 0.5%SDS, 0.1mM DTT a temperatura ambiente) y secado de los cristales se procedió a su lectura.

2.1.4 Lectura de la fluorescencia: Se utilizó el sistema de escaneado de micromatrices de *Agilent* (G2565AA). El tratamiento de las imágenes obtenidas se elaboró con el programa *Genepix* 5.0. (Axon). Este software permite establecer mallas o plantillas que contienen coordenadas para cada punto inmovilizado con la identificación correspondiente de cada una de las sondas impresas en el cristal. Tras el ajuste de dichas plantillas, se recoge el dato bruto de los distintos niveles de fluorescencia para el canal rojo y verde (relación Cy3/Cy5) en cada punto. Tras una normalización lineal (igualando a 1 la mediana de las diferencias entre las intensidades de fluorescencia), lo convierte en una matriz numérica, permitiendo así realizar los análisis posteriores.

2.1.5 Preprocesado de los datos y análisis de los resultados de expresión génica: Primeramente, la matriz de valores obtenida con el software *Genepix* para cada uno de los casos hibridados, fue exportada a *MS-Excel* donde se realizan los pasos preliminares de filtrado que consistieron en la eliminación de clones no válidos por sospecha de contaminación, bandas múltiples, sin datos, o que presentaban fallos al comprobar su secuencia.

Para los sucesivos análisis, se utilizaron en su mayoría las herramientas disponibles en la web de la unidad bioinformática del CNIO. Particularmente, el paquete GEPAS (<http://gepas.bioinfo.cnio.es/tools.html>) que fue diseñado para el procesamiento y análisis de los datos de expresión génica obtenidos a partir de micromatrices. Una nueva normalización con los datos de toda la serie se realizó mediante la herramienta DNMAD (*Diagnosis and Normalization of Microarray Data*): <http://dnmad.bioinfo.cnio.es> que asumía que

la mayoría de los genes analizados no estaban sobreexpresados ni reprimidos y transformaba los valores a logaritmo en base 2 (\log_2) para poder seguir trabajando sobre ellos. Seguidamente se utilizaron las herramientas de preprocesado que ajustaban los genes impresos por duplicado a su mediana, o los eliminaba si los valores de dichos replicados eran inconsistentes. Igualmente, se eliminaron aquellos genes no valorables en más de un 30% de las muestras. Para obtener los genes sobreexpresados o reprimidos, se filtraban aquellos que presentaban un patrón plano en cuanto a su nivel de expresión. Fijando el umbral en 0.5 ó -0,5 trabajando en valores \log_2 , obteníamos aquellos genes expresados 2 veces por encima o 2 veces por debajo de la referencia utilizada.

Posteriormente se utilizó el programa *TreeView* (*EisenLab*) que daba una primera aproximación a los resultados, aplicando un algoritmo de agrupación jerárquica no supervisada que clasificaba por un lado los genes y por otro los tumores. El resultado de este proceso era un dendrograma donde se ponía de manifiesto qué grupo de casos presentaban un nivel de expresión génica similar para los genes estudiados.

A partir de aquí se utilizaron diversas herramientas estadísticas de análisis de múltiples variables, utilizando agrupación de casos con características a priori conocidas: agrupación jerárquica supervisada:

- Selección de genes diferencialmente expresados entre dos (T de *Student*) o más clases definidas (Anova): Programa *Pomelo* (<http://pomelo.bioinfo.cnio.es>).

- Agrupación por función biológica de los genes seleccionados: programa *Fatigo* (<http://fatigo.bioinfo.cnio.es>).

2.1.6 Validación mediante PCR Cuantitativa a Tiempo Real (Sondas *Taqman*): Para obtener el molde, se realizó transcripción inversa a partir de 2 μ g de ARN total por caso a evaluar (4 tumores LEZM y 3 controles). Para ello se utilizaron la transcriptasa *SuperScript II* (200U) (*Invitrogen*) y hexámeros al azar como cebadores, en un volumen final de 20 μ l. Las muestras con el ARN, los hexámeros y los dNTPs en un primer paso se desnaturalizaban a 65°C durante 5 min. Una vez añadida la enzima, con su tampón de PCR, DTT e inhibidor de ribonucleasas (*RNAsin*), se mantenían 10 min. a temperatura ambiente para

continuar con un segundo paso de incubación durante 42°C durante 50 min. Se paralizaba la reacción con 70°C durante 15 min. y finalmente se almacenaba en frío el ADNc obtenido.

Se utilizaron, sobre este ADNc, **sondas TaqMan** diseñadas para cuantificar la expresión de dos de los genes encontrados como sobreexpresados con las micromatrices: *ARHH* y *SELL* y como control endógeno ya que se expresaba homogéneamente: *TFRC* (*Assays on Demand, Applied Biosystems*). El principio de esta técnica consiste en lo siguiente: la sonda presenta dos fluoróforos anclados en cada uno de sus extremos y se encuentra flanqueada por dos oligonucleótidos cebadores. Uno de los fluoróforos es fluorescente (*reporter*) y el otro es un “apagador” de esa fluorescencia (*quencher*). Cuando la PCR progresa *quencher* y *reporter* se separan y éste último comienza a emitir fluorescencia. En este caso se utilizaron FAM como *reporter* y TAMRA como *quencher*.

Para evaluar la reproducibilidad inter-experimentos, se elaboró una curva estándar con 4 concentraciones seriadas de un control de ADNc perteneciente a una línea celular de linfoma T (HuT78), con cada una de las concentraciones: 25ng, 5ng, 1ng, 0.2ng en un volumen de 20µl, donde se midieron tanto los genes de interés como el control endógeno. Se comprobó que en todos los casos existiera un coeficiente de correlación del 0.98 entre las curvas estándar. Para comprobar la reproducibilidad intra-experimento, se midió cada ADNc por triplicado en todas las muestras. Todas las PCRs se desarrollaron en el ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. El análisis de los resultados se realizó con el software Sequence Detector de Applied Biosystems donde se cuantificaron de manera relativa todos los niveles de expresión. Finalmente, se relativizaron los niveles obtenidos para los genes de interés en los tumores con los niveles de expresión, igualada a 1, en el conjunto de los 3 tejidos normales.

2.2 Técnicas de Inmunohistoquímica:

Se utilizaron secciones de tejido de 4 µm de los bloques fijados en formol e incluidos en parafina. La desparafinización de los cortes tuvo lugar durante 12 horas a 36°C. Posteriormente las secciones fueron hidratadas con 10min. en Xilol y 5 min. en cada solución de Etanol al 100%, 95%, 70% y finalmente H₂O 2 min. El desenmascaramiento antigénico se realizó con citrato sódico (10mM, pH 5.6) en olla a presión durante 3 min. Seguidamente, se inactivó la peroxidasa endógena con la solución bloqueante S2023 (DAKO) durante 5 min. para dar paso a la incubación con el anticuerpo primario seleccionado a la dilución, temperatura y tiempo de incubación adecuados. Tras el periodo de incubación se pasaba a la inmunodetección mediante anticuerpos secundarios de ratón o conejo biotinilados, estreptavidina unida a peroxidasa y diaminobenzidina como sustrato. Todas estas técnicas inmunohistoquímicas se realizaron de manera automatizada mediante el robot *TechMate* (DAKO). Finalmente, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina, lavadas y deshidratadas con dos pases de 30 sg. en etanol al 95% y al 100% y una hora en xilol.

Para los distintos estudios se seleccionaron una serie de anticuerpos frente a las proteínas de interés para validar algunos de los resultados obtenidos. Fueron los siguientes:

- **SYK** (Santa Cruz Biotechnology)
- **LYN** (Santa Cruz Biotechnology)
- **NF-kB/P65** (Santa Cruz Biotechnology)
- **BCL2** (DAKO)
- **ZAP-70** (Cellsignalling)
- **p-IkBα** (Cell signalling)
- **IgD** (DAKO)
- **CD38** (DAKO)
- **MIB1 (KI67)** (DAKO)
- **P53** (Novocastra)
- **TCL1** (DAKO)
- **p-AKT_(SER 473)** (Cell signalling)

2.2.1 Matrices de Tejido o TMA: Se construyeron dos TMA con muestras parafinadas procedentes de esplenectomía de 44 y 109 pacientes diagnosticados de LEZM. Para ello, se eligieron las zonas más representativas de cada caso a partir del bloque de tejido parafinado, y con un *tissue arrayer* se pincharon estas zonas con agujas para obtener cilindros de tejido de 1mm de diámetro que posteriormente se introdujeron con unas coordenadas concretas en un nuevo bloque de parafina. Todos los casos se introdujeron por duplicado en cada TMA, así como controles de bazo y ganglios reactivos.

2.2.1.2 Lectura de resultados: Todas las muestras fueron revisadas por los anatomopatólogos, directores de esta tesis: Dr. Miguel Angel Piris (MA) y Dra. Manuela Mollejo (MM). La cuantificación de la expresión proteica de los distintos marcadores se realizó de forma automatizada. Las preparaciones fueron escaneadas utilizando el escáner BLISS (*Bacus Laboratories*), el tratamiento de las imágenes capturadas se realizó con los softwares *Viewfinder* y *Studio Lite* 1.0 (Pixera) y para su cuantificación, se utilizó el software de análisis de imágenes *TMA score* 1.0 (*Bacus Laboratories*) que incluía el visualizador virtual *WebSlide* 1.0 (*Bacus Laboratories*).

2.3 Estudio de mutaciones somáticas en IgV_H

El estudio del estado mutacional en las regiones variables del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgV_H) y de las diferentes familias y subfamilias utilizadas en cada caso, se realizó a partir del ADN extraído de 44 muestras tumorales de tejido esplénico congelado procedentes de casos diagnosticados de LEZM, 35 de los cuales formaron parte de la serie utilizada en el trabajo original de Algara *et al.* en 2002.

Los reordenamientos del gen de la cadena pesada de las Ig (IgV_H) se amplificaron mediante PCR, tras comprobar su clonalidad y según el protocolo descrito (Algara, 2002; Camacho, 2003).

En una primera ronda de PCR se amplificaron 200 ng de ADN por cada caso en un volumen final de 50 µl de mezcla con:

- Tampón de PCR 1X
- 200µM de dNTPs
- 2.5 mM MgCl₂
- 250 nM de cada oligonucleótido (6 específicos para las distintas familias V_H en la región FR1 (*frame-work* 1) y 2 para la región constante J_H y J_H interno)
- 1U. de la enzima polimerasa *Ampli Taq Gold*.

Las condiciones de PCR de esta primera ronda consistieron en:

- 95° C durante 2 min.
- 59° C durante 2 min.
- 72° C durante 45 seg.
- 34 ciclos de (45 seg. a 95°C, 15 seg. a 59°C y 40 seg. a 72° C)
- 72° C durante 10 minutos.

La segunda ronda de PCR se realizó a partir de 1 µl de producto de la primera ronda y se llevaron a cabo 6 reacciones, una para cada uno de los 6 oligonucleótidos correspondientes a cada familia V_H. Se trata de una PCR semi-acotada y se añadió en cada reacción, un oligonucleótido para la región J_H interna. Se utilizaron las mismas concentraciones excepto para el MgCl₂ que fue 1.5mM. La segunda ronda consistió de un total de 25 ciclos, usando temperaturas de anillamiento de 65° C para las familias V_{H3} y V_{H4} y 61° C para el resto de las familias.

Los productos amplificados fueron testados mediante electroforesis en gel de agarosa y posteriormente secuenciados. La secuenciación directa se realizó en ambas hebras usando los mismos oligonucleótidos que en la segunda ronda de amplificación mediante el secuenciador *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) siguiendo las instrucciones del fabricante. El número de mutaciones somáticas fue determinado comparando las secuencias de los

productos amplificados con las secuencias germinales de las diferentes familias V_H usando las bases de datos de alineamiento Ig BLAST del Centro Internacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) y el directorio de secuencias V BASE (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-ok>).

Un caso se consideraba como mutado a nivel de IgV_H cuando la homología de la secuencia V_H amplificada respecto a la secuencia original de la línea germinal era inferior al 98%. Los casos con <2% de variación respecto a la secuencia original han sido considerados no mutados.

2.4 Western Blotting (WB):

Para medir el grado de activación/fosforilación de algunos marcadores, se llevaron a cabo ensayos con anticuerpos específicos contra epítopos fosforilados mediante *Western Blot* (WB). Para ello se utilizó proteína total extraída de cortes procedentes de 12 bloques de tejido esplénico congelado: 10 casos de LEZM y 2 controles (1 PTI y 1 rotura esplénica) incluidos en la serie. Como controles de la técnica, se utilizaron extractos proteínicos comerciales de una línea celular (Jurkat), tratada o no con inhibidores selectivos (LY29402 y Calyculin A) de las moléculas a valorar (Cell signalling)

La extracción se llevó a cabo de modo que se mantuviera íntegro el grado de fosforilación de las proteínas a analizar, lisando las células en tampón de lisis RIPA, modificado y enriquecido con inhibidores de proteasas y fosfatasas (10mM Tris-HCl pH7.4, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 1% Tritón X-100, 2mg/ml beta-glicerofosfato, 10mM NaF, 130mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% desoxicolato sódico, 0.1 mM ortovanadato sódico, 1 mM PMSF, 5ug/ml de leupeptina y 5ug/ul de aprotinina). Todo el proceso se llevo a cabo a 4°C para evitar la desnaturalización proteínica.

Los extractos proteínicos se separaron utilizando geles de poliacrilamida y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Hybond-ECL*; Amersham Biosciences). Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios frente a p -I κ B α , p -AKT (Ser473) y p -GSK3 β (Ser9) (Cell signalling) y α -

TUBULINA [DM1A] (Abcam) como control de carga según las recomendaciones de la casa comercial.

Tras una hora de incubación con el anticuerpo secundario conjugado a HRP (dilución 1:12000) se reveló la inmunoreactividad mediante quimioluminiscencia (Amersham Biosciences) mediante procedimientos estándar.

2.5 Inmunofluorescencia:

Para co-localizar dos proteínas (p-AKT y TCL1) dentro de las células tumorales de LEZM, se realizó un ensayo de doble inmunofluorescencia indirecta para ambos marcadores de acuerdo con métodos estándar. El ensayo, en lugar de realizarse sobre muestras procedentes de esplenectomía, se desarrolló sobre 3 biopsias de ganglios hiliares infiltrados por el tumor para evitar contaminación con otros tipos celulares esplénicos.

Los cortes, incluidos en parafina, tras los procesos de desparafinización, exposición del antígeno, fijación y bloqueo, se incubaron con los mismos anticuerpos usados en el TMA específicos para las proteínas TCL1 y *p*-AKT(SER 473). Posteriormente se incubaron con las fracciones variables (Fab) de anticuerpos secundarios anti-conejo conjugadas con Cy3 (para el canal rojo) en el caso de *p*-AKT(SER 473) o anti-ratón conjugadas con Alexa Fluor 488 (para el canal verde) (Molecular Probes) en el caso de TCL1 (proporcionados por el Dr. Megías (CNIO)). Como controles de la técnica se procesaron en paralelo dos cortes seriados más, uno en ausencia de anticuerpos primarios y otro en ausencia de secundarios. Se valoraron en la unidad de Citometría y Microscopía Confocal del Programa de Biotecnología del CNIO, donde se desarrolló con el sistema de microscopía laser confocal TCS SP2 (Leica Microsystems), la técnica del Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): fluorescencia tras transferencia de energía por resonancia) que mide en porcentaje la unión de dos fluoróforos mediante microscopía confocal.

2.6 Análisis de la expresión de miRNAs:

2.6.1 Separación de células B esplénicas con microesferas magnéticas: A partir de una muestra de material esplénico en fresco dentro de las 24 horas posteriores a la esplenectomía post-traumática, se obtuvo una suspensión celular lo más homogénea posible mediante procedimientos mecánicos. Se realizaron varios lavados con PBS para después someter a estas células a una primera separación mediante gradiente de densidad con *Ficoll-Paque* (GE Healthcare). De esta manera se enriquece la muestra en células mononucleares y adicionalmente se eliminan los restos celulares que podrían unirse inespecíficamente en la separación con microesferas magnéticas posterior.

Para la separación de células B de este tejido esplénico en fresco se utilizó el kit de *MACS (Magnetic Cell Sorting): B Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotech) que se fundamenta en una mezcla de anticuerpos frente a marcadores de células mononucleadas que no son CD19+ como lo son los linfocitos B. Este “cocktail” de anticuerpos contiene aquellos contra: CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 y CD235a (Glicoforina A) y por tanto realiza una selección negativa de las células B sin las posibles interferencias que en futuros experimentos podrían causar la unión de esos anticuerpos (inducción de proliferación, diferenciación, apoptosis, etc...)

El rendimiento de la separación de células B intactas fue evaluado en el citómetro de flujo mediante el marcaje con el anticuerpo anti-CD19-FITC (Beckman) sobre tres alícuotas correspondientes a cada una de las 3 fracciones obtenidas (células mononucleares previas a la separación con microesferas, células B intactas y células no B retenidas).

2.6.2 PCR cuantitativa (SYBR GREEN): Para analizar la expresión de miRNAs, la extracción de ARN total se realizó con Trizol (*Gibco*) a partir de 32 bloques de tejido esplénico congelado (27 tumorales y 5 controles) y del botón celular enriquecido en células CD19+ obtenido a partir de la separación con microesferas magnéticas. Los 27 casos tumorales correspondían a los

diagnósticos de 20 LEZM y 7 no LEZM con afectación esplénica (4LLC-B, 2 MCL y 1 FL)

Para medir la expresión de miRNAs en su forma madura se desarrolló la técnica de PCR cuantitativa basada en el agente fluorescente intercalante SYBR Green I. Las moléculas de SYBR Green I se introducen en la doble hélice de ADN con alta afinidad, lo que no ocurre con las cadenas sencillas. Así, cuando la PCR comienza a progresar, sus productos lineales hacen que se libere mayor intensidad de fluorescencia. Para tal efecto se utilizó el kit de detección de miRNAs *mirVana* (Ambion) con primers en horquilla diseñados para cada uno de los miRNAs a analizar: *hsa-mir-29a* y *hsa-mir-29b-1* así como para el control endógeno: 5s. El control endógeno elegido, además de expresarse homogéneamente en todas las muestras, podía considerarse una medida de la calidad de los ARNs de fracción pequeña. Todas las PCRs se realizaron en el ABI Prism 7500 (*Applied Biosystems*) por triplicado para cada caso y bajo las condiciones recomendadas por los fabricantes.

El método de cuantificación relativa utilizado fue el **método $2^{-\Delta\Delta CT}$** . Este método se basa en cálculos aritméticos usando el valor Ct para hacer un cálculo relativo del nivel de expresión, donde:

$$[\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{controles o calibrador}}]$$
$$[\Delta CT = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{control endógeno}}]$$

Así la cantidad de molde sería $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Los resultados fueron analizados con el software de detección de secuencias *Sequence Detection Software* (SDS) del sistema 7500 (*Applied Biosystems*). Se utilizaron un conjunto de 5 muestras de tejido esplénico reactivo como control y finalmente, para eliminar el ruido de la expresión de otros tipos celulares, todos los datos se relativizaron con la expresión obtenida en las células B aisladas.

2.7 Análisis estadísticos:

Para los diferentes análisis se utilizaron bien las herramientas de análisis para múltiples variables disponibles en el recurso web POMELO perteneciente al paquete GEPAS en el caso del análisis de expresión génica masiva, o bien el paquete estadístico SPSS para correlacionar los resultados obtenidos con otros parámetros clínicos o moleculares. Se utilizaron, por un lado, el coeficiente de correlación de Spearman para investigar la correlación entre variables cuantitativas lineales y los tests de Fisher o de la Chi cuadrado para comparar las variables cualitativas. Para el análisis estadístico de la supervivencia se utilizaron los métodos Kaplan-Meier y la regresión del Cox. Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier generadas se compararon con la prueba *log-rank*. Los modelos de Cox univariante o multivariante se utilizaron para estudiar la posible asociación entre las diferentes variables y la probabilidad de supervivencia global asociada a enfermedad (SG) o el intervalo o supervivencia libre de progresión (SLP). Los modelos Cox devolvían riesgos relativos (RR) estimados dentro de un intervalo de confianza (I.C.) del 95%. Las diferencias fueron consideradas significativas siempre que el valor *p* asociado a la prueba estadística de contraste era menor que 0.05 o bien cuando el *FDR* (*False Discovery Rate* o tasa de falsos positivos) resultó menor que 0.2.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Análisis del patrón de expresión en LEZM

1.1 Datos clínicos de la serie

Se incluyeron un total de 44 pacientes diagnosticados de LEZM de los cuales 19 (43%) eran varones y 25 (57%) mujeres. La edad media al diagnóstico era de 66 años (44-80 años). 41 pacientes fueron diagnosticados en estadio clínico IV con infiltración en médula ósea, 1 en estadio II y 2 en estadio I. Todos los pacientes fueron sometidos a esplenectomía bien por criterios diagnósticos o bien por terapéuticos. Doce pacientes recibieron adicionalmente quimioterapia como tratamiento.

La mediana de seguimiento fue de 3 años y en el momento del análisis, 30 (68%) de pacientes estaban vivos, 11 (25%) habían muerto a causa del linfoma y 3 (7%) habían muerto por otras causas no relacionadas. La tasa estimada de SG a los 3 años era del 74%. Veinte casos progresaron (45%) con una tasa de SLP a los 3 años del 62% de los pacientes.

1.2 Expresión génica (Micromatrices de ADNc):

En el análisis con micromatrices se incluyeron un total de 27 muestras de LEZM. Un total de 4834 genes se pudieron analizar tras los primeros filtrados. Esta expresión se normalizó comparándola con la expresión de los 5 bazo normales/reactivos utilizados como control.

Una primera aproximación en forma de agrupación (*clustering*) jerárquica “no supervisada” con la expresión normalizada de todos los genes analizados revela un perfil de expresión molecular relativamente homogéneo en los LEZM agrupando todos los casos en una única rama principal (Figura 8)

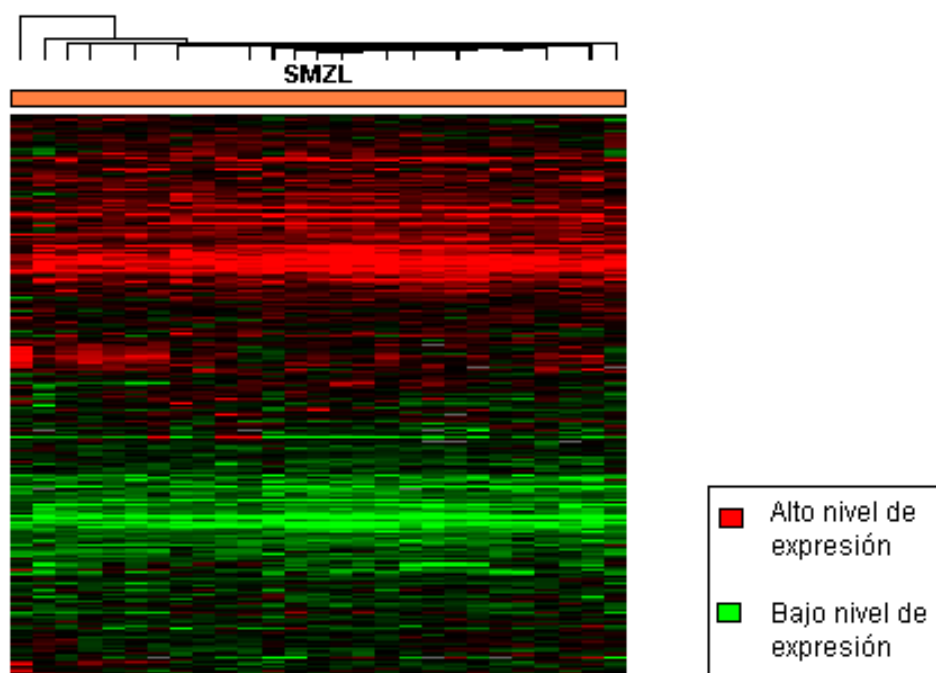


Figura 8. Perfil de expression génica en LEZM. Demuestra la homogeneidad en este tipo de linfoma.

1.2.1 Firma molecular

De aquellos 4834 genes analizados, se obtuvo una firma molecular para los LEZM compuesta por 144 genes desregulados (56 sobreexpresados y 88 reprimidos) considerando como desregulados aquellos cuya expresión era de 2 veces mayor o menor que la del tejido esplénico normal/reactivo en al menos el 50% de las muestras.

Un análisis preliminar a nivel funcional basado en ontología génica con herramientas bioinformáticas revela que el grupo funcional que contiene un mayor número de genes desregulados en este tumor es el de comunicación celular (50%) y de aquellos implicados en metabolismo (46%), seguidos de los involucrados en procesos fisiológicos a nivel celular y de organismo y respuesta a estímulos (43%, 37% y 42%, respectivamente).

1.2.2 Genes sobreexpresados

Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Son de destacar los genes incluidos en funciones relevantes en la supervivencia del linfocito B como *TOSO* y *BIRC3* implicados directamente en fenómenos de **apoptosis**, aquellos que forman parte de rutas como la **señalización a partir del receptor de células B (BCR)**: las tirosin-quinazas *SYK* y *BTK*, del **Factor de Necrosis Tumoral (TNF)** o de la **activación del Factor Nuclear anti-apoptótico NF-κB**: *BIRC3*, *TRAF3*, *TRAF5*, *CD40* ó *LTB*.

Por otro lado, es de particular interés el hallazgo de la sobreexpresión de genes relacionados con el **microambiente esplénico** como la Selectina L (*SELL*), molécula de adhesión que juega un importante papel en la interacción leucocito-endotelio o la Leupaxina (*LPXM*), una molécula señal leucocito-específica expresada a muy altos niveles también en el bazo normal.

Otro interesante grupo de genes es aquel implicado en **transducción de señales y comunicación celular** como *MIG* (CXCL9) citoquina con función quimiotáctica, ligando para el receptor CXCR3, cuya expresión en respuesta a interferón parece requerir también una activación constitutiva de NF-κB y que se ha visto frecuentemente asociada al desarrollo tumoral (Hiroi, 2003). *PTPN1* que codifica para una protein-tirosin-quinasa que regula una gran variedad de procesos celulares incluyendo crecimiento celular, diferenciación, ciclo mitótico y transformación oncogénica (Chernoff, 1990). Otro ejemplo es *UBD* (Ubiquitina D o FAT10) que también está implicada en la modulación del ciclo celular pero específicamente durante el desarrollo y activación de los linfocitos B y células dendríticas (Liu, 1999).

Y por ultimo resaltar la presencia de **oncogenes** que ya han sido asociados con neoplasias hematológicas como *ARHH* que codifica para la GTPasa RHO/TTF y *TCL1A* cuya proteína se ha descrito como sobreexpresada en otros tipos de linfomas B de célula pequeña (Preudhomme, 2000; Hoyer, 2002)

Tabla 2. Firma molecular en los LEZM. En esta tabla figuran aquellos genes con función conocida y que su sobreexpresión parece caracterizar la biología tumoral de los LEZM. Se indican si están incluidos en grupos funcionales como comunicación (**C**), apoptosis (**A**) o metabolismo (**M**) celular y si son genes con función relevante dentro de las rutas de activación a partir del receptor de células B (**BCR**) y la vía anti-apoptótica **NF-kB**. El nivel de expresión se encuentra definido como la mediana de la cantidad de veces expresado por encima del nivel normal. Los genes más llamativos se encuentran en negrita.

GEN	C	A	M	BCR NF-kB	NIVEL EXP	DESCRIPCIÓN
MIG					4.52	Citoquina implicada en transducción de señales en el metabolismo de la glucosa.
MS4A2					4.18	Célula B: Fc del receptor IgE, cadena β , en mastocitos y basófilos.
UBD					3.71	UBIQUITINA D, FAT10, marcador de células B y dendríticas.
HLA-DMA					3.22	Célula B: HLA-DM, cadena α , clase II, en lisosomas de células B. (RING 6)
ARHH					3.22	Miembro de la super-familia del oncogen Ras.
SYK					3.19	Activador de respuestas a partir de BCR. Regulación del Ca^{2+} intracelular.
PCDH9					3.09	Miembro de la super-familia de caderinas Ca^{2+} -dependientes.
E2F5					2.75	Regulador trascricional dentro del ciclo celular: forma el complejo E2F4/E2F5.
TOSO					2.72	Regulador de apoptosis Fas-inducida en células T.
SELL					2.64	Molécula de adhesión necesaria en la relocalización de linfocitos esplénicos.
TCL1A					2.54	Gen para la cadena α del TCR humano. Coactivador de AKT en células B.
AIM2					2.44	Miembro de la familia de genes interferon-inducibles: en bazo, i.d. y leucocitos.
SP140					2.37	Proteína del cuerpo nuclear linfocito-específica.
PTK1					2.34	Actividad protein-quinasa, puede jugar un papel en la meiosis.
LPXN					2.30	Leupaxina, expresada a muy altos niveles en el bazo.
PIR121					2.29	Proteína P53-inducible.
ITM2A					2.29	Proteína integral de membrana: en células hematopoyéticas CD34+ humanas.
PTPRC					2.28	CD45, papel principal en la activación y señalización a partir de BCR y TCR.
NSF					2.24	Factor requerido para el transporte mediado por vesículas.
PTPN1					2.23	Fosfatasa clave en señalización, control del ciclo y transformación neoplásica.
RASSF2					2.22	Dominio 2 de asociación a Ras.
CDW52					2.20	Antígeno CAMPATH-1
HLA-DMB					2.06	Célula B: HLA-DM, cadena β , clase II,
BIRC3					2.05	HIAP1, inhibidor de apoptosis, interacciona con TRAF1 y TRAF2.
TNFRSF5					2.05	CD40: clave en la activación T Ig-dependiente y formación de células B de memoria.
EIF4B					2.01	Unión a ARN, iniciación de biosíntesis proteica.
BTAF1					2.01	Regulador trascricional en asociación con la proteína de unión a TATA (TBP).
TRAF3					2.00	Transductor de señales asociado al dominio citoplásmico del TNFR, CD40 y LTBR.
TRAF5					1.99	Interactúa con el LTBR y activa NF-kB.
AMPD3					1.96	Metabolismo de las purinas.
POU2AF1					1.93	Coactivador trascricional, esencial para la respuesta antigénica y formación de CG.
ADD3					1.93	Unión a calmodulina.
EGR2					1.90	Factor de transcripción. Unión a ADN.
WBP1					1.85	Interacción proteína-proteína.
ENPP2					1.80	ATX: Metabolismo de las purinas. Diana específica de transformación mediada por v-jun.
BTk					1.71	Transducción de señales en células B, esencial para su activación.
PDE4B					1.66	Fosfodiesterasa cAMP-específica.
ICSBP1					1.61	Factor regulador de interferón expresado exclusivamente en células del sistema inmune.
LTB					1.54	Linfotoxina β (Superfamilia del TNF, miembro 3)
CR2					1.41	Receptor de EBV y C3 en linfocitos B.
PTPRO					1.41	Protein-tirosin-fosfatasa inducible por agentes de diferenciación.
SCYB6					1.40	CXCL6, citoquina en granulocitos humanos.
CD2					1.24	Receptor de eritrocitos en células T.
RARRES3					1.03	Gen regulador del crecimiento de tumores ácido retinóico inducible.

1.2.3 Genes reprimidos (deleción de 7q31-32)

Con respecto a los genes reprimidos, se enfocó el estudio en aquellos genes localizados en la región de 7q que era conocida como perdida en alrededor de un 40% a un 45% de los casos de LEZM. (Mateo, 1999)

Pudieron ser analizados mediante esta técnica un total de 13 genes que se localizan en 7q31-32. En comparación con los resultados obtenidos para los genes localizados en otras regiones del genoma como 3p o 7p, encontramos que todos los genes que se pudieron analizar en la región de 7q31-32, a excepción del gen *MET*(12/13), se expresaban a un nivel más bajo que en el bazo normal y que además 3 de ellos estaban dentro de lo que se consideraban genes reprimidos (*CAV1*, *CAV2* y *GNG11*), expresándose 2 veces por debajo en los tumores cuando se comparan con el tejido normal en más de la mitad de los casos.

En la Figura 9, gracias a la herramienta bioinformática denominada “CGH *in silico*” de la web del CNIO, se pueden observar representados los patrones de expresión de los distintos casos incluidos en la serie a lo largo de un ideograma del cromosoma 7:

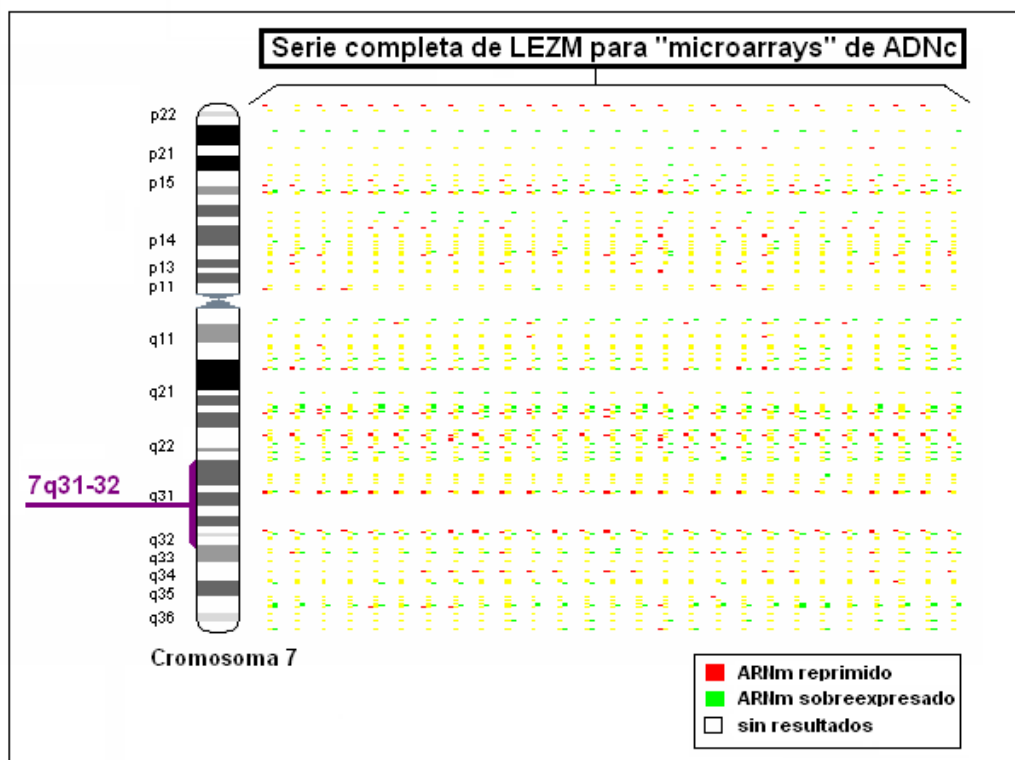


Figura 9. Representación gráfica de la expresión génica a lo largo del cromosoma 7 mediante micromatrices de ADNc. Muestra la densidad de genes perdidos en la zona frecuentemente perdida 7q31-32.

Adicionalmente, se compararon nuestros datos con los de un trabajo previo en el que se describían las pérdidas en 7q por la técnica de pérdida de heterocigosidad (LOH) (Mateo, 1999). Disponíamos de datos de delección por LOH en 7q31-32 para 7 de los casos incluidos en esta serie. Sólo 2 de estos 7 casos presentaban pérdida de heterocigosidad (2/7 LOH positivos).

En resumen, el nivel de expresión de los genes localizados en 7q31-32 era uniformemente bajo, con la única excepción del gen *MET*, independientemente de las pérdidas de 7q encontradas por LOH.

1.2.4 Diagnóstico diferencial de LEZM frente a otros LBCP.

Con el objetivo de identificar marcadores que pudieran ser útiles en el diagnóstico diferencial de esta entidad frente a otros linfomas B no Hodgkin (LNH) de bajo grado, se comparó el perfil de expresión génica de la serie de LEZM frente a otra serie de linfomas B que incluía: 20 LLC-B, 38 LCM y 12 LF usando la misma plataforma de micromatrices (Martínez, 2003; Rodríguez, 2004).

Primero, se normalizaron los datos de expresión de todos los tumores con la media de los cambios de expresión obtenidos para cada uno de los casos sin tener en cuenta la entidad a la que pertenecían. Con los datos así normalizados, se elaboró un análisis de la varianza para múltiples tests (ANOVA) encontrando hasta 266 genes cuyo nivel de expresión en LEZM era mayor que en el resto de tumores (Figura 10 A). La sobreexpresión de *CCND1* (ARNm para Ciclina D1) encontrada únicamente en la serie de LCM daba consistencia a este primer análisis.

Después, con el objetivo de eliminar los genes que aparecían como diferenciales pero que podrían ser específicos de tejido, se comparó mediante una T de Student para múltiples tests la expresión de estos 266 genes en LEZM frente al grupo de tejido esplénico reactivo. Así, se identificaron un pequeño grupo de genes LEZM-específicos: *ILF1* (Factor de unión a Interleuquina 1) ($P < 0.01$; FDR < 0.172), *KIAA0625* (Senataxina) ($P < 0.01$; FDR < 0.165) y *TNFRSF5* (CD40, P50) ($P < 0.01$; FDR < 0.172) (Figura 10 B).

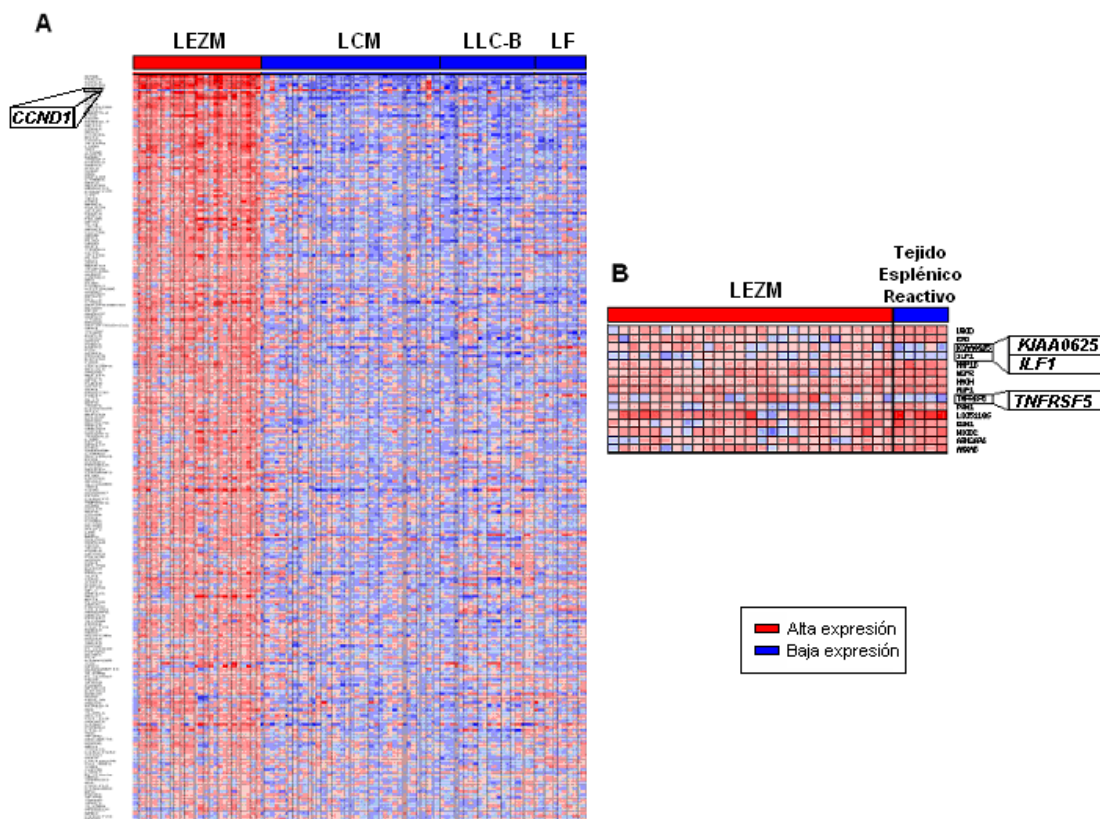


Figura 10. Identificación de genes diferenciales de LEZM frente a otros LNH de bajo grado. Se representan los 266 genes con un nivel de expresión mayor en LEZM (**A**), así como los 3 genes LEZM-específicos encontrados (**B**).

1.2.5 Análisis de supervivencia en base al perfil de expresión génica.

Debido a las dificultades que presentaba un análisis de supervivencia con gran cantidad de variables, este análisis se realizó utilizando los genes por grupos funcionales. Estos grupos fueron: Apoptosis, señalización a partir de BCR, ciclo celular, activación de NF- κ B y respuesta a estrés (Rodríguez, 2004).

Cada grupo se analizó independientemente mediante un modelo Cox univariante y reveló que el grupo funcional con mayor peso en supervivencia era el implicado en la ruta de activación de NF- κ B. Por un lado 25 genes para SLP y por otro, 5 genes para SG liderados en significatividad por *REL* codificante para la subunidad c-REL de NF- κ B ; (FDR<0.2)

El subsiguiente análisis multivariante determinó que únicamente los genes *PRKCA* [RR (IC del 95%): 2.02 (1.27-3.21); $P < 0.001$] y *ADAM17* [RR (IC del 95%): 0.37(0.19-0.71); $P < 0.001$] se comportaban como factores pronósticos independientes para SLP (Figura 11)

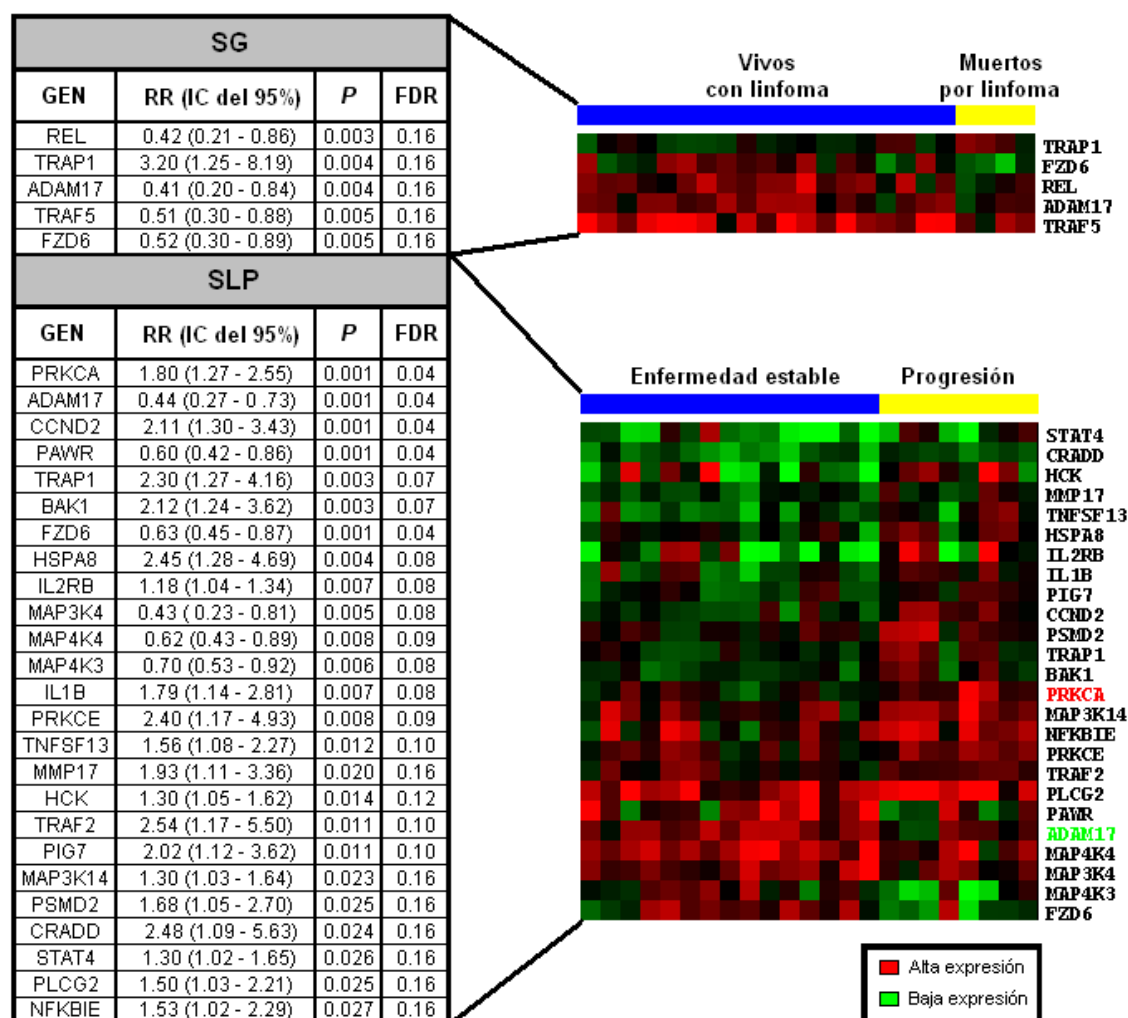


Figura 11. Genes de la ruta NF-κB implicados en supervivencia: Tabla con los resultados de Riesgo relativo (RR) dentro de un intervalo de confianza del 95% (IC del 95%) para cada uno de los genes de la ruta NF-κB que resultaron significativos tras el análisis de regresión del Cox. Anexa a la tabla se encuentra la representación gráfica del agrupamiento de los genes en función de su nivel de expresión y estado de supervivencia de cada paciente incluido en el análisis.

1.2.6 Validación Cuantitativa

La firma molecular de LEZM obtenida mediante el análisis de micromatrices de ADNc se validó comparándola con los resultados obtenidos mediante otra técnica de análisis de expresión como es la PCR cuantitativa por transcripción inversa (*qRT-PCR*) para 2 de los genes encontrados con una mayor expresión en toda la serie: *ARHH* y *SELL*. Los niveles de expresión estimados para ambos genes eran similares en ambas técnicas. Como se observa en la figura 12, se confirma la sobre-expresión de *ARHH* y *SELL* en todos los casos analizados cuando se compara con la expresión correspondiente al conjunto de tejido esplénico normal utilizado como control.

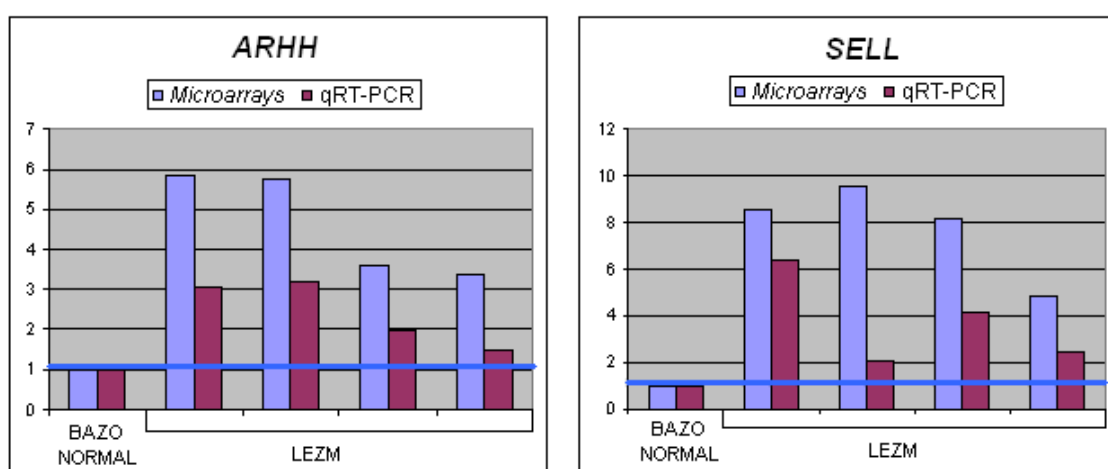


Figura 12. Validación de resultados obtenidos mediante micromatrices de ADNc por qRT-PCR: Se representan las relaciones entre la expresión de los LEZM frente a la del control igualada a la unidad medidas con ambas técnicas: micromatrices de ADNc ■ y qRT-PCR ■.

1.3 Expresión de proteínas (TMA)

Se analizó un TMA incluyendo un total de 44 casos que incluían aquellos 27 contenidos en el estudio basado en micromatrices de ADNc.

Se valoró el marcaje por inmunohistoquímica con anticuerpos frente a las proteínas SYK, LYN, BCL2, ZAP-70, p -I κ B α , IgD, BCL6, Ciclina D1, P65, CD38, MIB1 (KI67) y P53.

1.3.1 Perfil de expresión de proteínas.

En la Tabla 3 se describen los resultados. La expresión de Ki67 (Mib1) como indicador del índice de proliferación se correlacionaba fuertemente con la de CD38, proteína de superficie presente en múltiples células del sistema inmunitario cuya expresión se ha encontrado relacionada con el grado de activación de dichas células, la quinasa SYK y P53, implicado en el ciclo celular. La expresión de SYK a su vez se correlacionaba de manera significativa con CD38 y con la forma fosforilada (activa) de I κ B α que se considera una medida directa de la activación de la vía antiapoptótica NF- κ B (p -I κ B α). En la Figura 13 se muestran las imágenes de algunos de estos marcadores más representativos:

Tabla 3. Resumen de resultados obtenidos con el análisis de la expresión mediante TMA.

	EXPRESION			SUPERVIVENCIA		CORRELACION			
	MEDIANA	RANGO	EVALUACIÓN VISUAL	SG	SLP				
KI67	3.19	0.04–19.53	Expresión nuclear	ns	p<0.05	KI67			
P53	0.08	0.01–20.07	Expresión nuclear	ns	ns	p<0.05			
SYK	32.78	0.54–80.38	Expresión citoplásmica	ns	p<0.05	p<0.05	SYK		
CD38	36.4	1.42–67.80	Expresión citoplásmica	p<0.05	p<0.05	p<0.001	p<0.05		
LYN	32.51	19.95–82.62	Expresión citoplásmica variable	ns	ns	ns	ns		
p-IκBα	2.33	0.02–67.58	Expresión nuclear y citoplásmica	ns	ns	ns	p<0.001	CD38	
IgD	18.46	1.44–73.28	Expresión citoplásmica/superficial variable	ns	ns	p<0.05	ns	p<0.05	
P65	10.48	0.04–73.15	Expresión nuclear y citoplásmica	ns	ns	ns	ns	ns	p-IκBα
ZAP-70	37.76	4.74–71.54	Expresión citoplásmica	ns	ns	p<0.01	p<0.05	ns	p<0.05

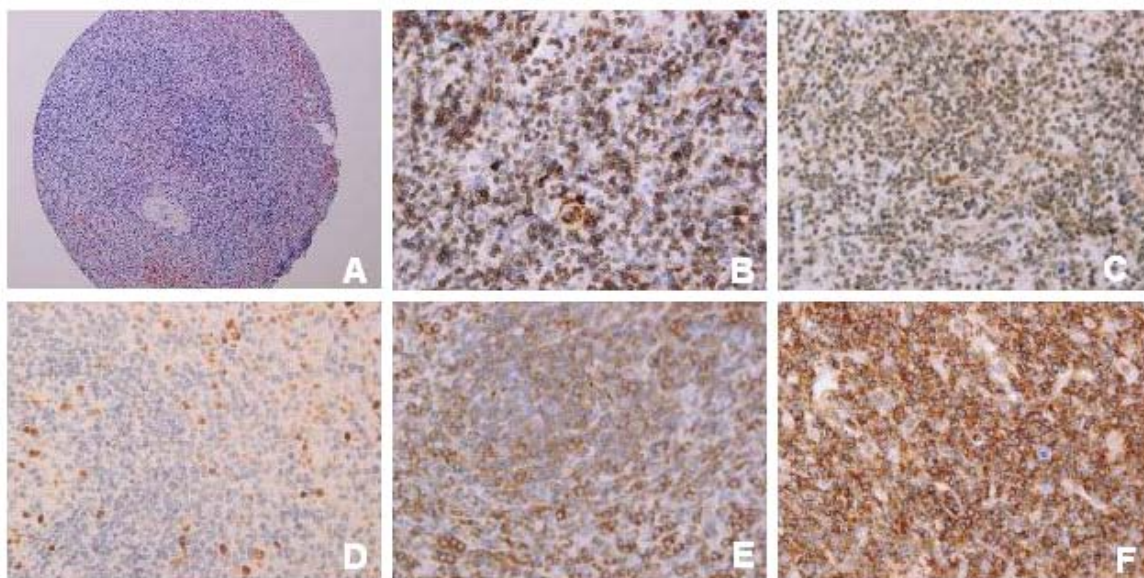


Figura 13. Imágenes del marcaje por inmunohistoquímica para los marcadores más representativos en el TMA. [A:100x (H&E de un cilindro de 1mm de diámetro de un caso de LEZM); B, C, D, E y F: 400x (B: CD38; C: pIkB α ; D: KI67; E: P65; F: SYK)]

1.3.2 Análisis de supervivencia

Para elaborar un análisis de supervivencia mediante Cox univariante con estos datos, la serie fue dividida en 2 grupos en función de la mediana de la expresión en toda la serie. Este análisis mostró que los casos con altos niveles de **CD38** tenían una **SG** asociada a enfermedad mas corta ($p < 0.05$) y que además altos niveles de KI67 y SYK se asociaban con una SLP menor ($p < 0.05$). Teniendo en cuenta el escaso número de observaciones y la fuerte correlación observada entre ambos marcadores, sólo **KI67** permanecía como estadísticamente significativo para la **SLP** en el modelo multivariante subsiguiente.

1.4 Hipermutación somática en IgV_H

El estudio en el gen IgV_H se realizó a partir del ADN obtenido de 44 casos. 37 muestras presentaron reordenamiento monoclonal. La distribución en familias del gen que presentaban reordenamiento mostraban el uso preferencial de la familia génica V_{H1} y las subfamilias más prevalentes en toda la serie de LEZM fueron V_{H1-2} (46% de los casos) seguido de V_{H3-30} (16%) y V_{H4-34} (13.6%).

El análisis mutacional revela un 59% de casos mutados frente a un 41% de no mutados. El análisis de supervivencia Kaplan-Meier confirma un mejor pronóstico para el grupo de casos mutados ($p < 0.05$) donde la tasa de supervivencia asociada a enfermedad a los 3 años era de un 41% en el grupo no mutado y de un 90% en el grupo mutado.

Estos resultados confirman los obtenidos en un trabajo previo en una serie algo inferior de casos (Algara, 2002). Los resultados se resumen en la Figura 14.

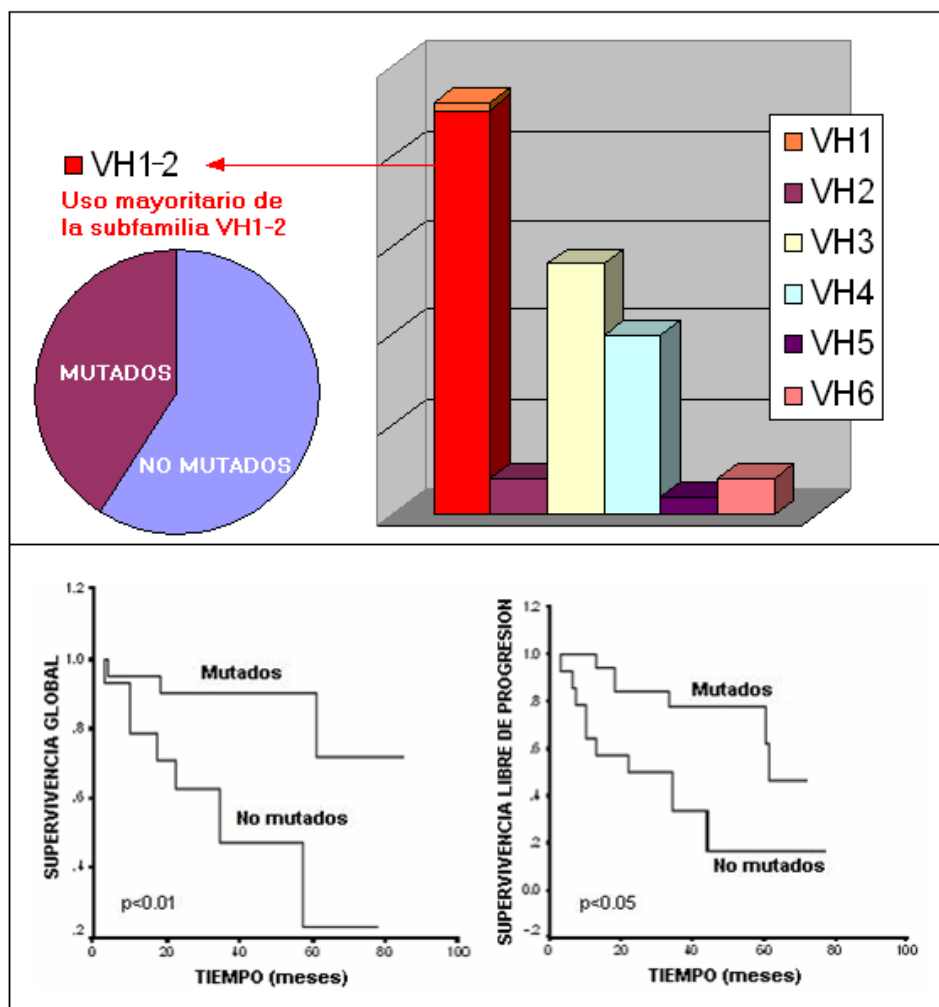


Figura 14. Hipermutación somática en IgV_H en LEZM. En la figura se representan las distribuciones en familias génicas de reordenamiento así como el porcentaje de casos mutados (arriba) en LEZM, así como las curvas de supervivencia asociadas al estado mutacional en IgV_H en este tipo tumoral (abajo).

1.4.1 Análisis comparativo entre el fenómeno de hipermutación somática en IgV_H y patrón de expresión en LEZM.

La presencia de mutaciones en IgV_H y el patrón de expresión proteínica de CD38 encontrada en el TMA se encuentran significativamente correlacionadas (test de Fisher, $p < 0.05$) (Tabla 4).

Adicionalmente, comparando el perfil de expresión génica perteneciente a los grupos de casos mutados y no mutados mediante una T de *Student* para múltiples variables, se encuentra que tan sólo uno de los genes: **RAD54L** tenía expresión diferencial significativamente asociada al índice mutacional ($p < 0.01$; FDR=0.075).

RAD54L es un gen involucrado en la reparación del ADN a nivel de recombinación homóloga en células somáticas (Mills, 2004).

Tabla 4. Correlación entre el estado mutacional en *IgV_H* y la expresión de CD38.

		Expresión de CD38		
		Bajo <36.40	Alto >36.40	mediana
Estado mutacional <i>IgV_H</i>	No mutados	4	11	39.65
	Mutados	15	7	30.42

1.5 Integración de los análisis de supervivencia: Propuestas para nuevos marcadores con valor pronóstico.

En resumen, a pesar de que se trata de una serie pequeña para confirmar estas variables como factores pronósticos independientes, con estos análisis se han podido revelar los siguientes posibles marcadores predictivos biológicos:

- **Estado mutacional en *IgV_H*:** El análisis Kaplan-Meier confirma que tanto la SG asociada a enfermedad como la SLP, son más largas en el grupo de casos mutados para el gen *IgV_H*

- **Expresión proteínica de CD38, KI67 y SYK:** De la misma forma, de los resultados obtenidos a partir del TMA, se encontró que la sobre-expresión de estos marcadores está relacionada con una menor SG

asociada a enfermedad en el caso de CD38 y una SLP más corta en el caso de KI67 y SYK.

- **Expresión de genes implicados en la vía anti-apoptótica**

NF- κ B: El análisis de regresión del Cox sobre los datos obtenidos a partir del estudio con micromatrices de ADNc revela esta vía como la de más peso en cuanto a SG y SLP.

2 Validación y demostración de funcionalidad de las rutas encontradas como relevantes en LEZM.

Tal y como se comentaba en la introducción de esta tesis es clave la validación de los marcadores revelados tras estudios basados en el análisis de múltiples marcadores, demostrando su funcionalidad con estudios moleculares adicionales, así como validándolos en una serie de casos independiente.

Las rutas candidatas a su implicación en el desarrollo tumoral de los LEZM y por tanto sujetas a este estudio subsiguiente fueron:

- **Transducción de señales a partir de BCR.**
- **Vías anti-apoptóticas NF- κ B y PI3K/AKT y su relación con el oncogen *TCL1A*.**

La sobreexpresión de ciertos genes en estos tumores no tiene por qué implicar una funcionalidad dentro de la célula, pueden darse modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales que hagan que no se sinteticen la proteínas correspondientes para cada uno de estos genes. Muchas de las moléculas implicadas en las rutas que habían sido encontradas reiteradamente en estos análisis previos eran quinasas o fosfatasa cuyo grado de activación se puede medir en función de su grado de fosforilación.

Para demostrar por tanto su **funcionalidad**, llevamos a cabo los siguientes ensayos:

- Evaluamos por un lado la presencia de p -I κ B α , p -AKT y p -GSK3 β con anticuerpos específicos contra **epítomos fosforilados** mediante WB.

En todos los tumores analizados se encontró **positividad** con expresividad variable. Esta positividad también se encontró en los bloques de bazo control. Nos encontramos con el problema mediante esta técnica de análisis sobre proteína total, de la heterogeneidad celular del bazo. Estas proteínas se activan de manera fisiológica en otros tipos celulares no linfoides pertenecientes a la población esplénica que están implicados en fenómenos inflamatorios como pueden ser los monocitos o macrófagos. Un ejemplo de las imágenes obtenidas se encuentra en la Figura 15:

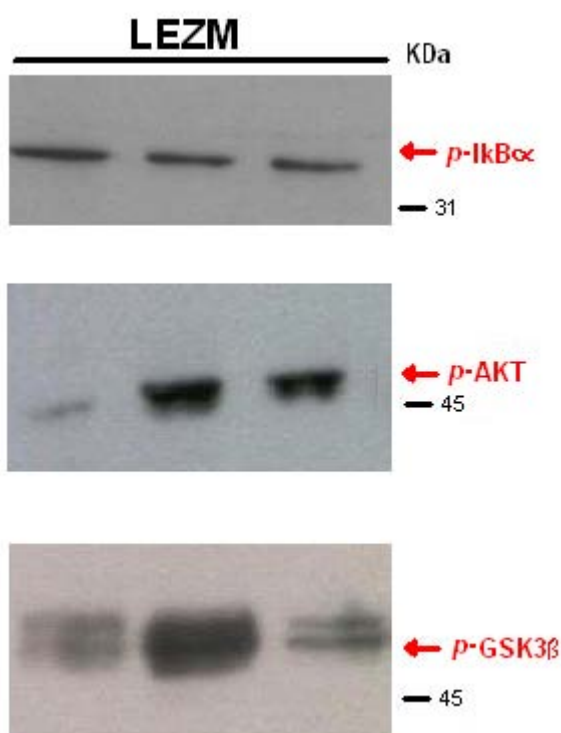


Figura 15. Positividad de las proteínas fosforiladas mediante WB.

- Por otro lado se analizó la expresión de los marcadores CD38, SYK, TCL1 y p -AKT_(SER 473) en un nuevo TMA con una serie ampliada de 109

casos de LEZM y 6 controles con el objetivo de validar los resultados en una serie independiente.

Se describe expresión positiva para SYK y CD38 en un 60% y 45% de casos respectivamente corroborando la implicación de estos miembros de la señalización BCR en LEZM.

TCL1 resulta positivo en un 62% con distribución fundamentalmente nuclear y para p -AKT se describe expresión (difícilmente valorable) en prácticamente todos los casos con expresividad variable citoplásmica/nuclear (Figura 16). Sin embargo no se encontró correlación estadísticamente significativa entre el nivel de marcaje de ambos marcadores.

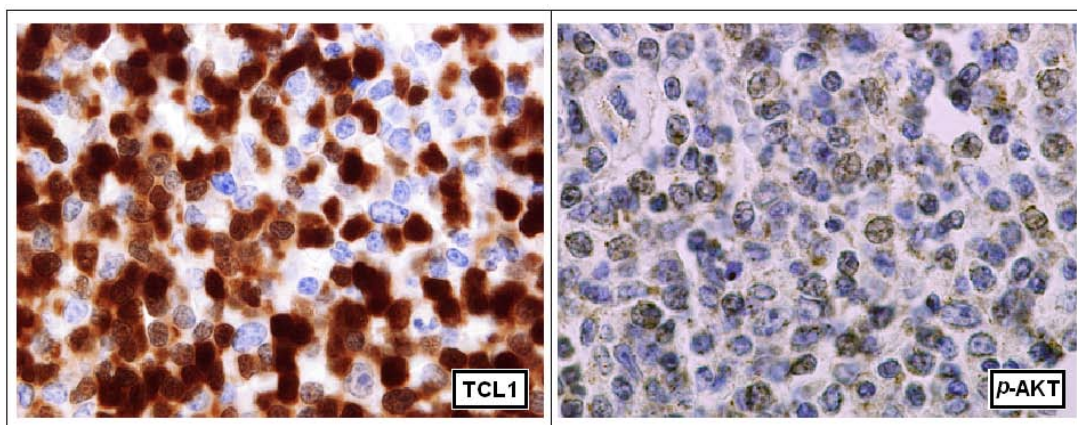


Figura 16. Imágenes del marcaje por inmunohistoquímica dentro del nuevo TMA para p -AKT y Tc11.

- Por último, para seguir investigando la **posibles interacciones** entre AKT y su supuesto oncogen coactivador *TCL1A* se realiza un doble ensayo con ambos marcadores con inmunofluorescencia utilizando posteriormente microscopía confocal y FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*).

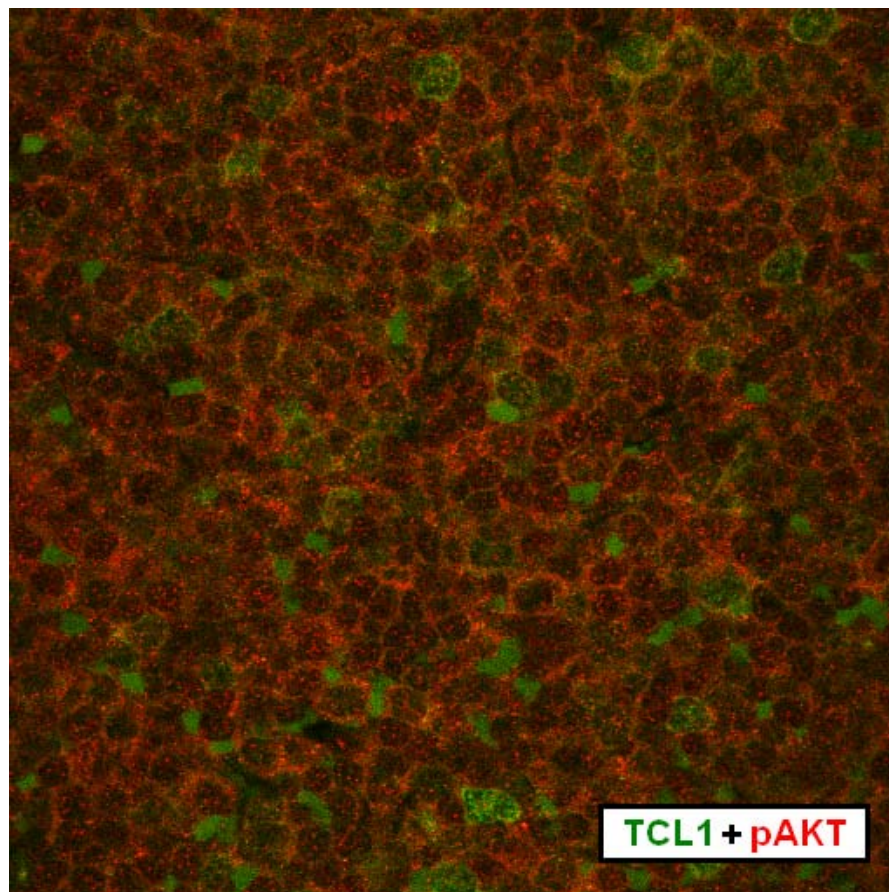


Figura 17. Imagen de microscopía confocal del marcaje por doble inmunofluorescencia para TCL1 (verde) y p-AKT (rojo).

Se observa que ambos marcadores presentaban un patrón de expresión distinto en diferentes células aunque sí que co-localizaban en algunos núcleos (Figura 17).

Se intentó valorar la *FRET* en aquellos núcleos en los que co-localizaban pero la eficiencia de la misma resultó del 0%, ambos marcadores aparentemente no se encontraban unidos en este tipo tumoral.

3 Estudio de expresión de miRNAs en la zona frecuentemente perdida en 7q

Finalmente, se quiso cuantificar la expresión de los microRNAs localizados en la Región Mínima de Común Deleción en LEZM (RMCD) en 7q32.

Para ello, se midió la expresión de los 2 miRNAs más distales en la RMCD: *hsa-mir-29a* y *hsa-mir-29b-1* en una serie de: 20 casos de LEZM y 6 tejidos esplénicos normales (4 procedentes de rotura esplénica y 2 de PTI). Adicionalmente se incluyeron los datos de expresión de células B aisladas mediante microesferas magnéticas, para normalizar la expresión de los tumores que como hemos visto pueden contener una proporción variable de células no tumorales. Para muchos de los casos de LEZM se disponían además datos de LOH en 7q (Mateo, 1999) y citogenética convencional.

Los resultados se resumen en la Tabla 1, el nivel de expresión de los miRNAs se considera como número de veces que se expresan diferencialmente en el tumor cuando se compara con el conjunto de los 5 bazos normales o inflamatorios y tras normalizarlo con las células B esplénicas reactivas aisladas.

Tabla 5. Descripción de la serie de LEZM sujeta al estudio de miRNAs. Los niveles de miRNA son valores expresados como cuantificaciones relativas basadas en el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Casos	LOH	Cariotipo	<i>hsa-mir-29a</i> $2^{-(\Delta\Delta CT)}$	<i>hsa-mir-29b-1</i> $2^{-(\Delta\Delta CT)}$
Células B esplénicas	Sin dato	Sin dato	1	1
LEZM1	+	46XX,del7q,t(1;15),del8q,del18q,del14q	0.385	0.279
LEZM2	+	46,XX,del(1)(q32)	0.633	0.538
LEZM3	+	44,XY,-20,-21,t(1;3)(q21;q21),del(8)(q22qter),-7,+der7,t(7;17)(p12p12),del(7)(q32)	0.352	0.250
LEZM4	+	46,XX,del(7)(q21q31)	0.987	0.634
LEZM5	+	47,XY,del(7q?),t(1;2)(q32q32),add17p13	0.645	0.383
LEZM6	-	Sin dato	0.405	0.336
LEZM7	-	Sin dato	0.481	0.416
LEZM8	-	46,XX,del(9)(p13p23)	0.837	0.955
LEZM9	-	46XY	0.340	0.388
LEZM10	-	Sin dato	0.459	0.407
LEZM11	-	85-90,XXY,1q-,t(1;2)(q32;q21),3p-,der(4),5p-,6q-,9p-,dup(10q),der(14q),der(17q),der(20q)	0.313	0.274
LEZM12	Sin dato	Sin dato	1.359	0.979
LEZM13	Sin dato	47,XY+19/47,X-Y,+19,+MARK	0.535	0.533
LEZM14	Sin dato	Sin dato	0.449	0.512
LEZM15	Sin dato	Sin dato	1.031	0.832
LEZM16	Sin dato	Sin dato	0.755	0.662
LEZM17	Sin dato	Sin dato	0.996	0.913
LEZM18	Sin dato	Sin dato	0.551	0.465
LEZM19	Sin dato	Sin dato	0.767	0.547
LEZM20	Sin dato	Sin dato	0.224	0.294

Como se observa, el nivel de expresión de los miRNAs era uniformemente más bajo que el de las células B control con solo dos excepciones. Este nivel además es independiente de las pérdidas en 7q. Adicionalmente encontrábamos que la expresión de ambos miRNAs era muy pareja, estaba correlacionada (Rho Spearman=0.9; $p<0.01$). La representación gráfica de estos resultados se puede ver en la figura (Figura 18A)

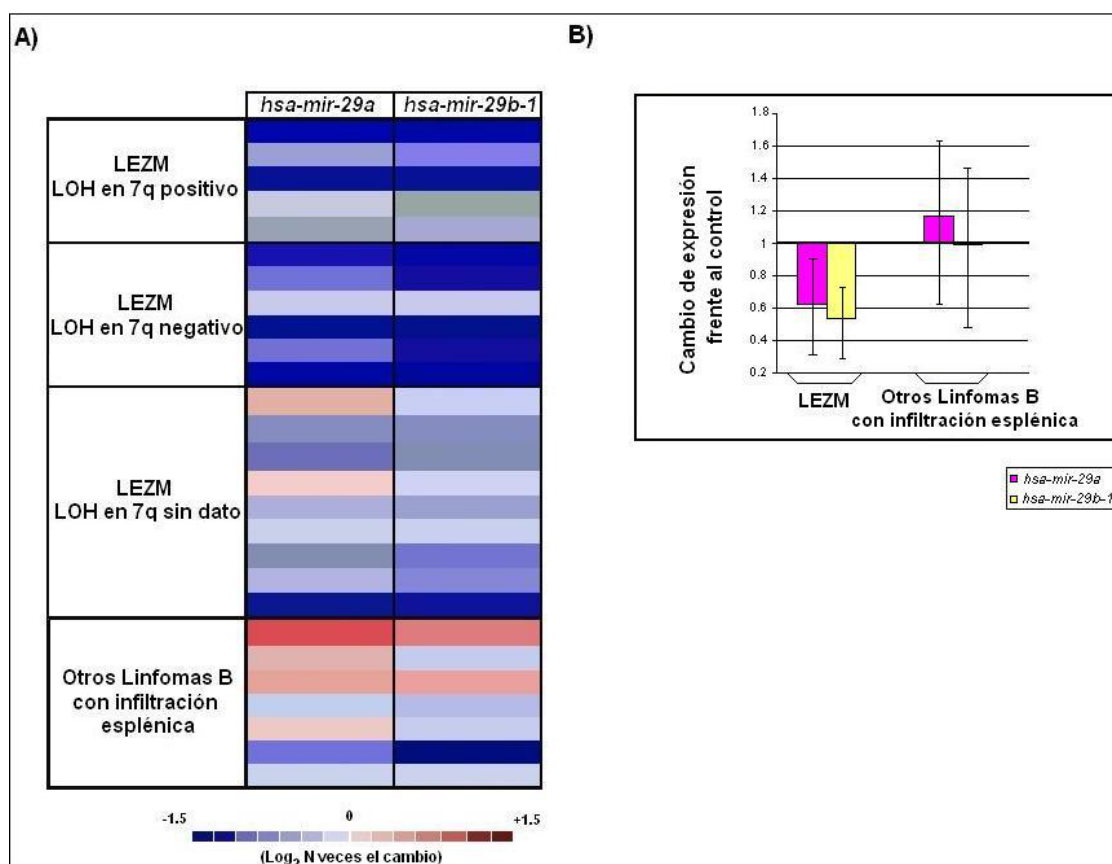


Figura 18. Perfil de expresión de los miRNAs (*hsa-mir-29a* y *hsa-mir-29b-1*) en 7q. A: Muestra el patrón de expresión de los miRNAs analizados en LEZM y LBCP utilizando como control la expresión de células B esplénicas aisladas; **B:** Gráfico de la comparación de medias de expresión en los dos grupos de linfomas analizados.

6.1 Comparación con otros LBCP

Con el objetivo de avanzar en el diagnóstico diferencial de estos tumores frente a otros linfomas B de bajo grado, se incluyeron dentro de este análisis 7 LBCP no LEZM con infiltración esplénica (1FL, 2LCM y 4 LLC-B).

Los resultados muestran que existe una tendencia en los miRNAs analizados a estar perdidos en la serie de LEZM mientras que en otros LBCP que infiltran el bazo hay una variabilidad en cuanto a esta expresión como se puede apreciar en la Figura 18A. De hecho, la expresión difiere significativamente entre ambos grupos (T de Student; $p < 0.05$) siendo más baja en la serie de LEZM (Figura 18B).

3.1 miRNAs de 7q implicados en la desregulación de la firma molecular de LEZM

Finalmente investigamos si los miRNAs localizados en la RMCD de 7q32 podía estar jugando un papel en la inducción de la firma molecular de los LEZM.

Para ello se usó el recurso web bioinformático: *miRBase Targets* (<http://microrna.sanger.ac.uk/targets/v4/>) que busca supuestas dianas para estos miRNAs basándose en las homologías de secuencia de promotores de genes con las de miRNAs incluidos hasta el momento en el registro. Las secuencias que utiliza son las que contiene la base de datos *Ensembl* (www.ensembl.org). De esta manera, en la búsqueda de miRNAs que pudieran estar regulando los genes que habíamos encontrado con una mayor expresión en LEZM, obtuvimos que *hsa-mir-29b-1* seguido de *hsa-mir-29a*, localizados en la RMCD de 7q, eran los mejores candidatos para estar regulando el oncogen *TCL1A*. La Figura 19 muestra la imagen que devolvió la herramienta bioinformática al lanzar *TCL1A* como posible diana.

Rfam ID	Score	Energy	Base P	Poisson P	Org P	Start	End	Alignment
hsa-miR-29b	18.5745	-24.51	2.76E-03	5.20E-03	4.85E-04	428	450	UUGUGACUAAA GUUUA CCA CGAU ACCA GTGGTCTCA CATGGTGCTA
hsa-miR-29c	17.8206	-21.88	4.94E-03	5.20E-03	4.85E-04	431	450	UGGCUAAA GUUUA CCA CGAU AGTGGTCTCA CATGGTGCTA
hsa-miR-29a	17.7325	-21.88	5.21E-03	5.20E-03	4.85E-04	430	450	UGGCUAAA GUUUA CCA CGAU AGTGGTCTCA CATGGTGCTA
hsa-miR-650	16.6179	-28.6	4.08E-02	4.00E-02	3.80E-03	7	28	CAGGACUCUCG CGA CGGAGGA GTCTTGGCAGCA CCTGTCTCCT
hsa-miR-601	16.3382	-25.78	2.53E-02	2.50E-02	7.53E-03	411	431	GGAGGUUGUUA GGAUCUGGU CCTCTGA-AA CCGTGGACCA
hsa-miR-552	16.3139	-22.2	2.82E-02	2.78E-02	6.83E-03	5	24	AA CAGAUUGGUCA GUGGACA TGGTCTTGGCAG-CA CCTGT
hsa-miR-619	16.296	-19.39	2.54E-02	2.51E-02	3.64E-03	236	259	UGA CCGUGUUGUA CA GGUCCA ATTTGGCAGAGCTTCTTCCAGGT
hsa-miR-431	15.7059	-23.8	3.80E-02	3.87E-03	7.85E-03	159	179	UGCCGGA CGUUCUG AGGGCCTGCAGGAC
hsa-miR-431	14.8953	-14.84	9.07E-02	3.87E-03	7.85E-03	802	822	ACGUACUGCCGGA CGUUCUGU TGATTGATTAAATGCAAGATA

Figura 19. miRNAs candidatos a regular *TCL1A*. Imagen modificada de la web de *miRBase Targets* (<http://microrna.sanger.ac.uk/targets/v4/>). Señalados en rojo se encuentran los miRNAs localizados en la RMCD de 7q en LEZM.

De hecho, en este trabajo se encontró sobreexpresión de la proteína *TCL1* en 14/19 casos incluidos en el análisis para miRNAs según los resultados de inmunohistoquímica para estos 19 casos.



DISCUSION

1 Importancia del análisis molecular con micromatrices en la clasificación de los LEZM.

El LEZM es reconocido como una entidad clínico-patológica en la clasificación de la OMS. A pesar del avance en el conocimiento de este linfoma, la ausencia de un marcador molecular o inmunofenotípico característico de este tumor puede hacer difícil establecer un diagnóstico preciso (Mollejo, 1995; Chacon, 2002; Thieblemont, 2003). Por otro lado, el curso clínico también puede ser sustancialmente variable y no hay una clara estratificación de pacientes en grupos de riesgo que permita un tratamiento individualizado en función de los factores pronósticos. La utilización de técnicas de análisis de expresión a gran escala, incluyendo micromatrices de ADN así como matrices de tejidos, permite profundizar en la caracterización molecular de estos tumores, en la búsqueda de nuevos marcadores útiles para el diagnóstico y en la identificación de factores pronósticos y de dianas terapéuticas con un carácter más específico.

Así, la serie de LEZM analizada mediante micromatrices de ADN presentaba un perfil de expresión fuertemente homogéneo agrupando todas las muestras tumorales en una única rama principal (**ARTICULO 1**).

Este hecho apoya que el LEZM constituye una entidad clínico-patológica única y confirma la validez de los criterios diagnósticos utilizados de acuerdo con la clasificación de la OMS. De la misma manera, la utilización de estas nuevas herramientas moleculares han dado soporte a la clasificación de otras neoplasias hematológicas de células B como son la LLC-B (Rosenwald, 2001 y Klein, 2001) o el LCM (Martínez, 2003 y Rosenwald, 2003).

2 Profundización en la patogenia molecular de las células neoplásicas de los LEZM.

La firma molecular del LEZM se determinó normalizando el patrón de expresión génica tumoral con el de tejido normal, obteniéndose un grupo de 144 genes desregulados, sobreexpresados o reprimidos, presentes en más del 50% de los casos (**ARTICULO 1**).

Los genes aquí descritos como sobre-expresados son sustancialmente diferentes a los encontrados por Tröen y colaboradores en el 2004, probablemente por las discrepancias en los criterios de selección de casos utilizados o el menor número de muestras incluidas en el mencionado análisis.

Algunos de los genes encontrados en el presente estudio con un mayor nivel de expresión han sido identificados previamente en otros procesos linfoproliferativos. Este es el caso de *MIG*, *ARHH* y *TCL1*.

El receptor para la citoquina *MIG*, CXCR3 ha sido identificado como participante en la quimiotaxis de las células B neoplásicas (Tierens, 1999) de manera específica en ciertos subtipos de linfomas T (Jones, 2000a), así como en otros procesos linfoproliferativos B no Hodgkin. Tanto la proteína CXCR3 como MIG se expresaban en subgrupos concretos de LBCP como la LLC-B, los LEZM y los LZM extraganglionares (Jones, 2000b).

El gen *ARHH* (RhoH/TTF) es un gen regulador de la activación de NF- κ B y P38 mediante otras Rho-GTPasas (Li, 2002). Se han descrito alteraciones cromosómicas recurrentes e hipermutación somática aberrante en este gen en determinados procesos neoplásicos de origen hematopoyético (más del 50% de LBCG y mielomas) (Pasqualucci, 2001).

Y finalmente el oncogen *TCL1* (*T-cell leukemia 1*), que a pesar de ser identificado originalmente en linfomas T, posteriormente se han demostrado altos niveles de expresión en una amplia variedad de linfomas B como LF, Linfoma de Burkitt, LBCG o LLC-B (Narducci, 2000). La expresión aberrante de este gen parece tener un papel fundamental en la linfomagénesis de células B

desencadenando preferentemente linfomas B en modelos animales (Hoyer, 2002).

2.1 Rutas claves en la patogenia de los LEZM

De manera genérica, en el perfil de expresión génica del LEZM se ha encontrado sobreexpresión en moléculas implicadas en procesos con un papel importante en cancer como son los fenómenos de apoptosis, supervivencia o ciclo celular.

Sin embargo, dentro del amplio repertorio de genes desregulados, llama la atención la alta densidad de genes que forman parte de las siguientes rutas con relaciones establecidas entre sí:

- **Señalización a partir de receptores: BCR, TNF**
- **Activación de la vía anti-apoptótica NF-kB**
- **Activación de la ruta PI3K/AKT a través del oncogen *Tcl1***

Todas estas moléculas tienen un nexo común en las rutas de señalización para supervivencia esenciales en los linfocitos B que se dan en sus diferentes estadios de activación y diferenciación (Gauld, 2002).

En la presente tesis se ha logrado demostrar la expresión de componentes de las **vías de activación/señalización BCR** no sólo a nivel de mensajero sino también a nivel de expresión de proteínas. Además, en el caso de algunas de las protein-quinasas implicadas, se ha podido detectar su expresión en estado activo (fosforilado) demostrando por tanto su funcionalidad en las células de LEZM.

Las tirosin quinasas de BCR: **SYK** y **BTK** son unas de las moléculas más fuertemente expresadas en el presente análisis. SYK es una quinasa citoplásmica, regulador central de la señalización a partir de BCR, que participa en fenómenos de apoptosis y progresión del ciclo celular que tienen lugar en las

células B (Cornall, 2000). La sobreexpresión de *SYK* junto con la de *BTK* en esta serie tumoral implica que la señalización a partir de estas moléculas tras la activación de BCR contribuye a la transducción de señales de supervivencia en las células neoplásicas de los LEZM.

La sobreexpresión de dichas moléculas probablemente desencadenada por la activación de BCR también ha sido demostrado mediante micromatrices en otro tipo de LBCP como la LLC-B (Rodríguez , 2004).

Es importante puntualizar el hecho de que la expresión de *SYK* se encuentre relacionada con el nivel de expresión de CD38 (factor pronóstico) y p-IkB α (ARTICULO 1). Esto hace que se encuentre un nexo de unión entre los procesos de señalización a partir de BCR con la activación de NF-kB y la expresión de CD38 como ya había sido descrito también nuevamente en células de LLC-B (Deaglio, 2003).

De la misma manera, la activación del factor de transcripción **NF-kB** parece tener un importante papel dentro de los LEZM, lo cual coincide con otras observaciones hechas bajo diferentes condiciones, en diferentes linfomas B y T. Este fenómeno común, merece especial atención ya que se comparten siempre los procesos de activación de esta misma ruta anti-apoptótica, pero con diferencias en algunos de los genes participantes en dicha activación. (Davis, 2001, Rodriguez, 2004 y Tracey, 2005).

En LEZM, *CD40*, *SYK*, *PRKCA*, *REL*, *BIRC3*, *TRAF3*, *TRAF5* y p-IkB α parecen ser especialmente importantes en la activación de NF-kB y además se encuentran asociados a la **señalización a partir del receptor del TNF**.

Por último, es importante destacar la relevancia de la ruta **PI3K/AKT** en este tipo de tumores, propuesta previamente en el trabajo de Thieblemont y colaboradores en el 2004. En ese artículo, se describía la identificación de genes asociados con la señalización intracelular a través de AKT1 como característica de los LEZM. En nuestro trabajo se demuestra la activación de una molécula efectora bien reconocida de la vía PI3K/AKT como es GSK3 β

(Yuan, 1999) en estos tumores. Además, se demuestra la sobreexpresión del oncogen *TCL1A* (**ARTICULO 1**) y su proteína correspondiente **TCL1**.

TCL1 no tiene actividad quinasa u otro tipo de actividad que pudiera considerarse con poder oncogénico per sé, si no que TCL1 tiene un papel oncogénico uniéndose a AKT1 e incrementando su grado de fosforilación y por tanto su actividad quinasa (Laine, 2002). Además existen dominios de unión entre TCL1 y AKT1 que se ha propuesto sirven para el acercamiento de AKT1 a la membrana citoplásmica, posterior oligomerización de AKT y finalmente aumento de las funciones efectoras de esta quinasa (Revisión de Teitell, 2005).

Nuestros resultados no han podido confirmar esta relación entre ambas moléculas dentro de los LEZM ya que no existía correlación estadística ni interacción aparente entre ambos marcadores.

La actividad del oncogen *TCL1A* queda pendiente de ser investigada tanto en relación a la identificación de sus mecanismos efectores, así como de las alteraciones subyacentes que implican su sobreexpresión en este tipo de linfoma.

En conjunto, parece que todos estos hallazgos podrían estar interrelacionados y encadenarse con los resultados de sobreexpresión de *SYK* y *BTK*. La activación de AKT mediada por la señalización a partir de BCR parece requerir la intervención de ambas moléculas (Craxton, 1999).

Así, a la ruta antiapoptótica PI3K/AKT, le correspondería un papel principal dentro de la red de mecanismos moleculares que conforman la patogenicia de la célula B en los LEZM.

Con los resultados de la presente tesis se puede elaborar un diagrama donde se recojan algunas de las moléculas que componen las redes de señalización celular con mayor relevancia dentro de cada célula tumoral del LEZM quedando representadas en la figura 20.

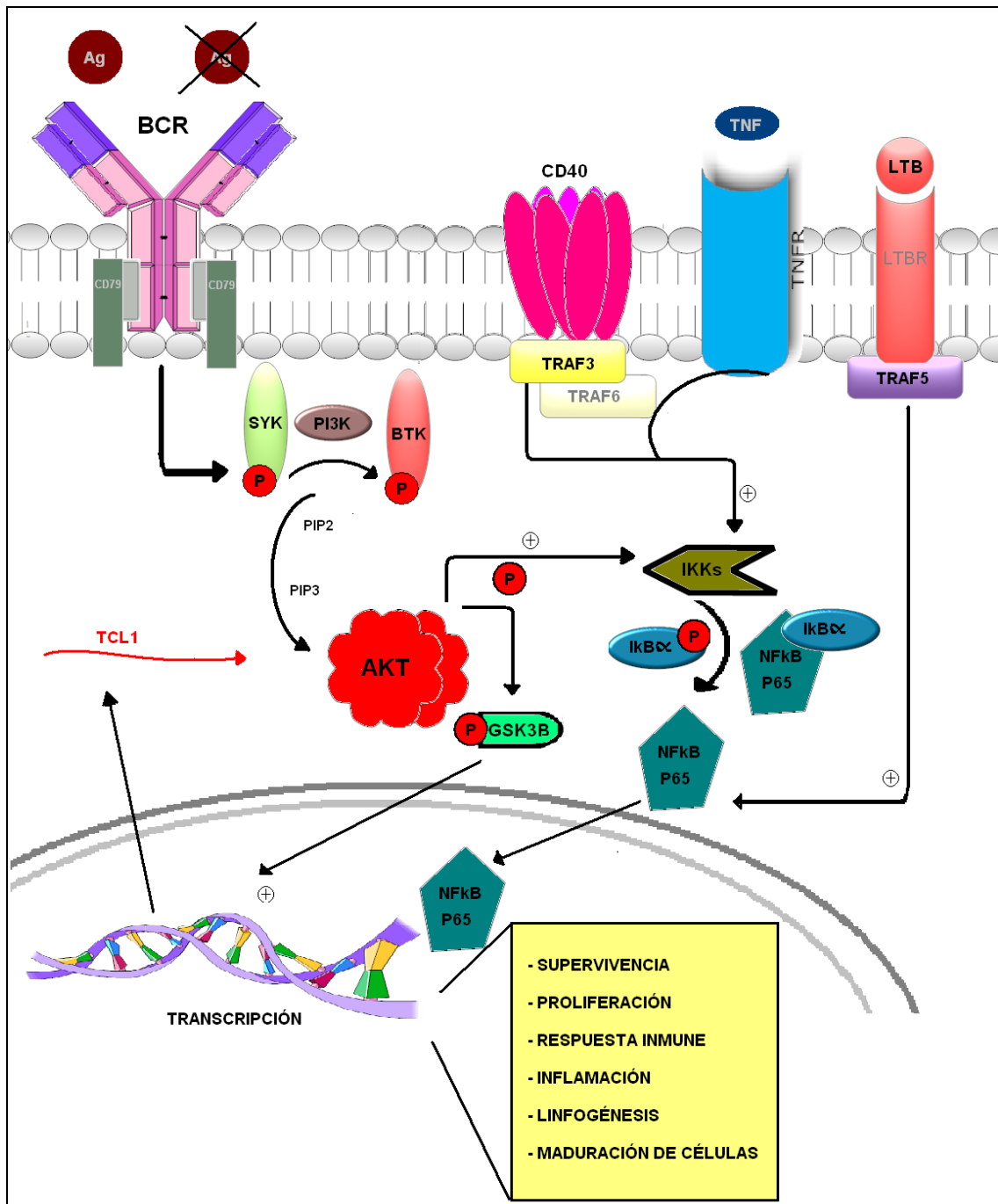


Figura 20. Diagrama de las rutas más relevantes en LEZM. En el diagrama quedan representadas las rutas principales dentro de las células LEZM reveladas en esta tesis. Como se observa, las moléculas implicadas participan tanto en fenómenos fisiológicos como onco-patogénicos dentro de la biología celular del linfocito B.

3 ¿Son las pérdidas en 7q el evento oncogénico inicial para el desencadenamiento del proceso neoplásico en los LEZM?

Los LEZM se caracterizan por las pérdidas en la región cromosómica 7q31-32 que se da en un 40% de los casos.

En el estudio con micromatrices se ha demostrado la disminución de expresión de los genes localizados en esta región. La mayoría (12/13) presentaban un nivel de expresión menor en los tumores que en el bazo normal y además, en 3 de ellos se observaba un nivel de expresión dos veces inferior al bazo normal en más de la mitad de las muestras incluídas en el estudio. Estos tres genes: *CAV1*, *CAV2* y *GNG11*, se podrían considerar, por tanto, genes reprimidos.

Por otro lado, se ha encontrado disminución en la expresión de miRNAs localizados en esta zona, tanto en tumores con pérdidas en la región cromosómica 7q31-32 como en tumores sin dicha alteración. Además, los niveles de estos miRNAs eran significativamente inferiores en los LEZM que en otros LBCP (**ARTICULO 2**).

Por tanto, en LEZM la disminución de expresión de genes y miRNAs localizados en esta región, era mayor de lo esperado y además independiente de LOH en 7q. Estos resultados implican que en los LEZM podrían existir alteraciones en las 2 copias de 7q como consecuencia de la pérdida de un alelo y concurrencia de otros procesos aún por identificar como metilación y/o mutación del otro alelo en esta región cromosómica. De hecho, los miRNAs se agrupan en islas altamente susceptibles a metilarse y ya han sido descritos fenómenos de mutación en las secuencias que codifican para estas moléculas en algunos casos de LLC-B (Calin, 2005).

Finalmente, en la presente tesis se sugiere que las pérdidas en 7q podrían constituir un evento oncogénico inicial clave en el desarrollo de los LEZM. Se propone que la desregulación de *TCL1A* en este tipo de linfomas podría venir

causada por una falta de silenciamiento del gen por parte de los miRNAs localizados en la región crítica de 7q. De hecho, la desregulación de este gen en linfomas B no se conoce. No existen reordenamientos asociados a la sobreexpresión de este oncogen (localizado en la región 14q32) como ocurre en linfomas T donde se han descrito traslocaciones con los loci para los genes del receptor de células T (TCR), o como ocurre en linfomas B con otros oncogenes o genes supresores de tumores. Previamente, ya se habían propuesto mecanismos epigenéticos como responsables (Rev. Teitell, 2005). El fenómeno de regulación de *TCL1A* por parte de *hsa-mir-29b-1*, *hsa-mir-29a* o de ambos dentro de esta entidad requiere confirmación experimental adicional pero es consistente con lo recientemente demostrado en células de LLC-B donde *miR-29* y *miR-181* regulaban la expresión de este oncogen (Pekarsky, 2006).

4 Avances en el diagnóstico diferencial frente a otros LBCLP.

El análisis con *micromatrices* de ADNc también ha permitido identificar potenciales marcadores para esta entidad con los que pudiera diferenciarse de otros procesos linfoproliferativos tipo B (*IL1F*, *Senataxina* y *CD40*). La relación entre *ILF1* y *Senataxina* con estos tipos de linfomas no ha podido ser bien establecida. *CD40* es el único de estos tres genes que está incluido en la firma molecular de LEZM. *CD40* tiene un papel en todos los estadios fisiológicos de la célula B asociado a su maduración y diferenciación a su paso por los CG. Sus funciones efectoras dependen nuevamente de la activación de NF- κ B (Basso, 2004). En una serie de LF recogida en un trabajo similar (Husson, 2002), *CD40* había sido identificado como uno de los genes más fuertemente reprimidos, contrariamente a lo que sucedía con LEZM.

Estos marcadores podrán ser validados en estudios independientes para determinar su utilidad práctica en el diagnóstico de esta enfermedad.

5 Aspectos pronósticos.

Uno de los aspectos más interesantes en este trabajo ha sido el poder relacionar datos moleculares obtenidos del tumor con los datos clínicos de los pacientes. De esta forma se han podido identificar nuevos marcadores con valor pronóstico que se desglosan en 3 parámetros:

- **Estado mutacional del gen *IgV_H***
- **Expresión de las proteínas CD38, SYK y KI67**
- **Expresión de un grupo de genes de la ruta NF-kB**

En los LEZM, parece que la expresión del marcador de superficie **CD38** se correlaciona con la ausencia de **mutaciones en el gen *IgV_H*** y ambos parámetros juntos se asocian a un curso clínico más agresivo. Estos datos son semejantes a los descritos en la LLC-B donde múltiples estudios muestran la expresión **CD38** y la ausencia de **mutaciones en el gen *IgV_H*** asociadas a un peor pronóstico (Damle, 1999; Ibrahim, 2001; Hamblin, 2002; Ghia, 2003)

Igualmente, la expresión de las **proteínas SYK y KI67** se asociaba a una mayor tendencia a la progresión y a su vez, sus niveles estaban correlacionados con los de CD38. Si tenemos en cuenta que SYK es una quinasa funcionalmente homóloga a ZAP-70, marcador bien reconocido en la práctica clínica en LLC-B para estratificar a los pacientes en distintos grupos de riesgo (Dürrig, 2003), este fenómeno podría extrapolarse a los LEZM y considerar a SYK como un posible sustituto de ZAP-70 en LLC-B como nuevo marcador con valor pronóstico para los casos de LEZM.

El análisis de supervivencia llevado a cabo mediante las micromatrices de ADN, revela que el grupo funcional de genes implicados en la **ruta NF-kB** guardaba relación con el pronóstico de los pacientes. Sobre este subgrupo de genes se destacaba *REL*, cuya expresión se asociaba a un mayor tiempo de supervivencia y *PRKCA* o *ADAM17*, relacionados con la posible progresión en estos pacientes.

Un incremento en el nivel de expresión del gen que codifica para c-REL podría relacionarse con la activación de su ruta anti-apoptótica, lo que de nuevo se mimetiza con las observaciones llevadas a cabo en LLC-B, donde un aumento en los niveles de expresión de p-IkB α (considerada una medida directa de la activación de NF-kB) estaba asociado con un curso clínico más favorable (Rodríguez, 2004).

PRKCA es un gen que codifica para la subunidad α del complejo PKC (proteína quinasa C) (PKC α) y su expresión se encontraba asociada a un curso clínico más agresivo. Esto podría involucrar nuevamente a las rutas de señalización a partir de BCR y/o TNF también con la supervivencia celular de los LEZM.

Sin embargo, la expresión de *ADAM* (TACE) estaba relacionada con un buen pronóstico en los pacientes incluidos en este estudio. TACE es una molécula que juega un papel primordial en la activación de la vía de señalización de Notch (Brou, 2000) cuya relevancia había sido anteriormente propuesta en este tipo de linfomas (Tröen, 2004).

En conjunto, la ausencia de mutaciones somáticas en el gen *IgV_H* y la expresión de varios marcadores revelados gracias a este tipo de análisis moleculares con micromatrices, podrían tener la capacidad de identificar a los pacientes que pueden desarrollar una enfermedad con un curso clínico más agresivo.

Son necesarios estudios en series independientes y con un número importante de pacientes para validar la utilidad de estos marcadores en la práctica clínica.

6 Propuestas para nuevas dianas de actuación terapéutica.

Finalmente, la presente tesis ha servido para proponer nuevas opciones de tratamiento para estos tumores. El conocimiento de los genes y las vías participantes en su oncogénesis, ha proporcionado la identificación de marcadores moleculares como potenciales dianas de actuación terapéutica.

Inhibidores específicos para ciertas moléculas incluidas en las rutas **PI3K/Akt** o **NF- κ B** pueden ser considerados como una de estas opciones para el tratamiento de los LEZM puesto que en este estudio se han mostrado que están implicadas en el desarrollo tumoral de este tipo de neoplasia. Ya existen investigaciones sobre inhibidores para estas rutas como posibles futuras opciones de tratamiento en neoplasias hematológicas (Dell'Eva, 2007). Moduladores dirigidos frente a **PKC α** han mostrado actividad anti-tumoral en células humanas, de hecho las isoenzimas de PKC ya habían sido descritas como potenciales dianas en los tratamientos anticancerígenos (Hofmann, 2004; Serova, 2006). Así mismo existe un inhibidor oral selectivo de la tirosin-quinasa **SYK** (Yamamoto, 2003).

La terapia con anticuerpos monoclonales anti-CD52, denominada Alemtuzumab (conocida como Campath, MabCampath o Campath-1H) es ampliamente utilizada en otros tipos de linfomas.

El gen codificante para la proteína **CD52**, también llamado Antígeno Campath, ha sido revelado en este trabajo como una de las moléculas más fuertemente sobreexpresadas en LEZM. Este hecho sugiere la valoración de la posibilidad de utilización de esta terapia frente a este tipo tumoral.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los estudios de patología molecular de las neoplasias humanas identifican marcadores diagnósticos y proponen dianas terapéuticas, proporcionando la base para estratificación de pacientes para su terapia. El linfoma esplénico de la zona marginal es una entidad recientemente descrita, que requiere investigaciones que permitan un diagnóstico preciso y una terapia racional.

1º El Linfoma esplénico de la zona marginal constituye molecularmente una entidad única y distinta de otros linfomas B de célula pequeña, según refleja su perfil de expresión homogéneo, apoyando los criterios diagnósticos y de clasificación de la Organización Mundial de la Salud.

2º Se han encontrado genes específicamente sobreexpresados en el linfoma esplénico de la zona marginal, que forman parte de lo que parecen ser rutas claves en su oncogénesis como la señalización a partir de receptores: TNF y BCR y la activación de las vías dependientes de NF-kB y PI3K/AKT, posiblemente dependiente del oncogen *TCL1*.

3º Genes diferencialmente expresados frente a otros linfomas B de célula pequeña con afectación esplénica: *IL1F*, *SETX* y *CD40* tienen una aplicación potencial en el diagnóstico diferencial.

4º Pueden considerarse marcadores con valor pronóstico potencial para los linfomas esplénicos de la zona marginal: El estado mutacional de los genes *IgV_H*, la expresión de las proteínas CD38, SYK y KI67 así como la expresión de un grupo de genes de la ruta NF-kB.

5º Se han revelado ciertas dianas con potencial interés terapéutico como las rutas PI3K/AKT, NF-kB y los genes *SYK*, *PRKCA* o *CD52*.

6º La región cromosómica 7q31-32, frecuentemente perdida en los linfomas esplénicos de la zona marginal, alberga genes reprimidos (*CAV1*, *CAV2* y *GNG11*), así como miRNAs perdidos (*hsa-mir-29b-1*, *hsa-mir-29a*), reguladores del oncogen *TCL1*, cuya pérdida se propone como mecanismo esencial a explorar en la oncogénesis de estos tumores.

BIBLIOGRAFÍA

Alberts *et al.* & James D. Watson: "Molecular Biology of the Cell" 4ªEd: *Gardland Sciences* (2006).

Algara P, Mateo MS, Sanchez-Beato M *et al.*: Analysis of the IgV(H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood* 2002; 99(4):1299-304.

Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. *let-7* microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(5):903-6.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503-11.

Arcaini L, Orlandi E, Scotti M, *et al.* Combination of rituximab, cyclophosphamide, and vincristine induces complete hematologic remission of splenic marginal zone lymphoma. *Clin Lymphoma* 2004; 4: 250–252.

Arcaini L, Lazzarino M, Colombo N, *et al.*: Splenic marginal zone lymphoma: a prognostic model for clinical use. *Blood* 2006; 107: 4643–4649.

Baldini L, Fracchiolla NS, Cro LM, *et al.*: Frequent p53 gene involvement in splenic B-cell leukemia/lymphomas of possible marginal zone origin. *Blood* 1994; 84: 270–278.

Basso K, Klein U, Niu H, *et al.* Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood* 2004;104:4088-4096.

Bates I, Bedu-Addo G, Rutherford TR, *et al.*: Circulating villous lymphocytes: a link between hyperreactive malarial splenomegaly and splenic lymphoma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 171-4.

Ben-Dor A, Bruhn L, Friedman N *et al.*: Tissue classification with gene expression profiles. *J Comput Biol* 2000;7(3-4):559-83.

Bentwich I, Avniel A, Karov Y, *et al.*: Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 2005 ;37(7):766-70.

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A *et al.*: bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 2003;113: 25-36.

Brou C, Logeat F, Gupta N, *et al.*: A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell.* 2000;5:207-216.

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR : Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 2004;10(12):1957-66.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M *et al.*: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS.* 2002;99(24):15524-9.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, *et al.*: Human miRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *PNAS* 2004; 101: 2999-3004.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, *et al.*: A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793–1801.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):857-66. Review.

Camacho FI, Mollejo M, Mateo MS, *et al.*: Progression to large B-cell lymphoma in splenic marginal zone lymphoma: a description of a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(10):1268-76.

Camacho FI, Algara P, Rodríguez A *et al.* Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood* 2003;101(10):4042-6.

Capello D, Gaidano G.:Molecular pathophysiology of indolent lymphoma. *Haematologica* 2000a;85(2):195-201. Review.

Capello D, Fais F, Vivenza D, *et al.*:Identification of three subgroups of B cell chronic lymphocytic leukemia based upon mutations of BCL-6 and IgV genes. *Leukemia*. 2000b;14(5):811-5.

Chacón JI, Mollejo M, Muñoz E, *et al.*: Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood* 2002 ;100(5):1648-54.

Chaganti RS, Nanjangud G, Schmidt H, *et al.* : Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: biologic and clinical significance. *Semin Hematol* 2000;37(4):396-411. Review.

Chen X.: A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in Arabidopsis Flower Development. *Science* 2003; 303(5666):2022-5.

Chernoff J, Schievella AR, Jost CA, *et al.* : Cloning of a cDNA for a major human protein-tyrosine-phosphatase. *PNAS* 1990;87:2735-2739.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, *et al.* : miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *PNAS*. 2005;102(39):13944-9.

Corcoran MM, Mould SJ, Orchard JA, *et al.*: Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations. *Oncogene* 1999; 18: 6271–6277

Cornall RJ, Cheng AM, Pawson T, *et al.*: Role of Syk in B-cell development and antigenreceptor signaling. *PNAS* 2000;97:1713-1718.

Craxton A, Jiang A, Kurosaki T, *et al.*: Syk and Bruton's tyrosine kinase are required for B cell antigen receptor-mediated activation of the kinase Akt. *J Biol Chem*. 1999;274:30644-30650.

Damle RN, Wasil T, Fais F, *et al.*:IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1840-1847.

Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, *et al.*: Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 2001;194:1861-1874.

Dell'Eva R, Ambrosini C, Vannini N, *et al.*: AKT/NF-kappaB inhibitor xanthohumol targets cell growth and angiogenesis in hematologic malignancies. *Cancer* 2007;110(9):2007-11.

Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, *et al.*: CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2003;102:2146-2155.

DeRisi J, Penland L, Brown PO, *et al.* : Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996; 14(4):457-60.

Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, *et al.* : (2003) Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA* 2003; 9(2): 180-6. Erratum in: *RNA* 9(5): 631-2.

Du MQ, Peng HZ, Dogan A, *et al.* : Preferential dissemination of B-cell gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma to the splenic marginal zone. *Blood* 1997; 90: 4071–4077.

Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, *et al.* : Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 21:10-14.

Dürig J, Nüchel H, Cremer M, *et al.* : ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003;17(12):2426-34.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, *et al.* : Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *PNAS* 1998;95(25):14863-8.

Falini B, Tiacci E, Pucciarini A, *et al.* Expression of the IRTA1 receptor identifies intraepithelial and subepithelial marginal zone B cells of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). *Blood* 2003;102(10):3684-92.

Franco V, Florena AM, Campesi G. : Intrasinusoidal bone marrow infiltration: a possible hallmark of splenic lymphoma. *Histopathology* 1996;29(6):571-5.

Fujita T, Asagoe K, Sakoda H. Successful treatment of splenic lymphoma with villous lymphocytes by rituximab and laparoscopic splenectomy. *Rinsho Ketsueki* 2003; 44: 249–253.

Gaidano G, Dalla-Favera R: "Molecular biology of lymphomas. Principles and Practice of Oncology." 5^a Ed: *Philadelphia: Lippincorr-Raven Publishers*. 1997a;2131-3145.

Gaidano G, Carbone A, Pastore C, *et al.*: Frequent mutation of the 5' noncoding region of the BCL-6 gene in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*. 1997b;89(10):3755-62.

Gartner & Hiatt: "Texto Atlas de Histología." 2a Ed: *Mc. Graw Hill* (2002)

Gauld SB, Dal Porto JM, Cambier JC. B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science*. 2002;296:1641–1642.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P *et al.* Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286(5439):531-7.

Ghia P, Guida G, Stella S, *et al.*: The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* 2003;101:1262-1269.

Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJ, *et al.*: Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood*. 2005;105(1):301-7.

Gruszka-Westwood AM, Hamoudi RA, Matutes E, *et al.*: p53 abnormalities in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood* 2001; 97: 3552–3558.

Gruszka-Westwood AM, Hamoudi R, Osborne L, *et al.*: Deletion mapping on the long arm of chromosome 7 in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:57-69

Hanahan D and Weinberg RA : The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 2000;100: 57–70. Review

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, *et al.* : Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-54.

Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, *et al.* : CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002;99:1023-1029.

Hammer RD, Glick AD, Greer JP, *et al.*: Splenic marginal zone lymphoma. A distinct B-cell neoplasm. *Am J Surg Pathol*. 1996;20(5):613-26.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H , *et al.*: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84(5):1361-92.

Hermine O, Lefrere F, Bronowicki JP, *et al.* : Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 89–94.

Hiroi M, Ohmori Y.: Constitutive nuclear factor kappaB activity is required to elicit interferon-gamma-induced expression of chemokine CXC ligand 9 (CXCL9) and CXCL10 in human tumour cell lines. *Biochem J* 2003;376:393-402.

Hofmann J. : Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2004;4:125-146.

Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, *et al.* : Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res* 1996;24(1):141-6.

Hoyer KK, French SW, Turner DE, *et al.* : Dysregulated TCL1 promotes multiple classes of mature B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:14392-14397

Hummel M, Stein H.:Clinical relevance of immunoglobulin mutation analysis. *Curr Opin Oncol.* 2000 ;12(5):395-402. Review.

Husson H, Carideo EG, Neuberg D, *et al.* : Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. *Blood* 2002;99:282-289.

Iannitto E, Minardi V, Callea V, *et al.*:Assessment of the frequency of additional cancers in patients with splenic marginal zone lymphoma. *Eur J Haematol* 2006; 76: 134–140.

Iannitto E, Ambrosetti A, Ammatuna E, *et al.*:Splenic marginal zone lymphoma with or without villous lymphocytes. Hematologic findings and outcomes in a series of 57 patients. *Cancer* 2004; 101: 2050–2057.

Ibrahim S, Keating M, Do KA, *et al.*:CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;98:181-186.

Isaacson PG, Matutes E, Burke M, *et al.*: The histopathology of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood* 1994;84(11):3828-34

Isaacson P PM.: Splenic marginal zone lymphoma. *Adv An Path* 1997; 4: 191–201.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H , *et al.*: World Health Organization Classification of Tumours: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. *IARC Press.* 2001.

Jones D, O'Hara C, Kraus MD, *et al.*: Expression pattern of T-cell-associated chemokine receptors and their chemokines correlates with specific subtypes of T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2000a;96:685-690.

Jones D, Benjamin RJ, Shahsafaei A, *et al.*: The chemokine receptor CXCR3 is expressed in a subset of B-cell lymphomas and is a marker of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000b;95(2):627-32.

Knowles DM: "Neoplastic Hematopathology" 2^oEd: *Lippincott Williams & Wilkins* (2001).

Karin M, Cao Y, Greten FR, *et al.*: NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):301-10.

Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, *et al.*: microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *PNAS* 2006;103(24):9136-41.

Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, *et al.*: Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194:1625-1638.

Küppers R, Klein U, Hansmann ML, *et al.*: Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 1999;341(20):1520-9. Review.

Laine J, Kunstle G, Obata T, *et al.*: Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family. *J Biol Chem* 2002;277:3743-3751

Lander ES, Linton LM, Birren B , *et al.*: International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822):860-921.

Larkin JE, Frank BC, Gavras H , *et al.*: Independence and reproducibility across microarray platforms. *Nat Methods* 2005;2(5):337-44.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, *et al.*: MiRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO* 2002;21: 4663-4670.

Lee Y, Ahn C, Han J, *et al.*: The nuclear RNase III Drosha initiates miRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75: 843-854.

Li X, Bu X, Lu B, *et al.*: The hematopoiesis-specific GTP-binding protein RhoH is GTPase deficient and modulates activities of other Rho GTPases by an inhibitory function. *Mol Cell Biol* 2002;22:1158-1171.

Lim LP, Glasner ME, Yekta S, *et al.*: Vertebrate microRNA genes. *Science* 2003 ;299: 1540.

Liu YC, Pan J, Zhang C, *et al.*: A MHC-encoded ubiquitin-like protein (FAT10) binds noncovalently to the spindle assembly checkpoint protein MAD2. *PNAS* 1999;96:4313-4318.

Lund E, Guttinger S, Calado A, *et al.*: Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 2004; 303(5654):95-8.

Martinez N, Camacho FI, Algara P, *et al.*: The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival. *Cancer Res* 2003;63(23):8226-32.

Mateo M, Mollejo M, Villuendas R, *et al.*: 7q31-32 allelic loss is a frequent finding in splenic marginal zone lymphoma. *Am J Pathol.* 1999;154(5):1583-9.

Mateo MS, Mollejo M, Villuendas R, *et al.*: Molecular heterogeneity of splenic marginal zone lymphomas: analysis of mutations in the 5' non-coding region of the *bcl-6* gene. *Leukemia* 2001; 15: 628–634.

Matutes E, Oscier D, Montalban C, *et al.*: Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia.* 2007 ;22(3):487-95. Review

Michiels S, Koscielny S, Hill C.: Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet* 2005;365(9458):488-92.

Migliazza A, Martinotti S, Chen W, *et al.*: Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the *BCL6* gene in B-cell lymphoma. *PNAS* . 1995;92(26):12520-4.

Mills KD, Ferguson DO, Essers J, Eckersdorff M, Kanaar R, Alt FW. Rad54 and DNA ligase IV cooperate to maintain mammalian chromatid stability. *Genes Dev* 2004;18:1283-1292.

- Mollejo M, Menárguez J, Lloret E, *et al.*: Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low-grade B-cell lymphoma. A clinicopathological study of 13 cases. *Am J Surg Pathol* 1995 Oct;19(10):1146-57.
- Mollejo M, Lloret E, Menárguez J, *et al.*: Lymph node involvement by splenic marginal zone lymphoma: morphological and immunohistochemical features. *Am J Surg Pathol*. 1997;21(7):772-80.
- Mollejo M, Camacho FI, Algara P, *et al.*: Nodal and splenic marginal zone B cell lymphomas. *Hematol Oncol*. 2005;23(3-4):108-18. Review.
- Morente M, Piris MA, Orradre JL, *et al.*: Human tonsil intraepithelial B cells: a marginal zone-related subpopulation. *J Clin Pathol*. 1992;45(8):668-72.
- Narducci MG, Pescarmona E, Lazzeri C, *et al.*: Regulation of TCL1 expression in B- and T-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues. *Cancer Res* 2000;60(8):2095-100.
- Naylor M, Capra JD: Mutational status of Ig VH genes provides clinically valuable information in B- cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999, 94:1837-1839.
- Parry-Jones N, Matutes E, Gruszka-Westwood AM *et al.*: Prognostic features of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a report on 129 patients. *Br J Haematol* 2003; 120: 759–764.
- Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, *et al.*: BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *PNAS* 1998;95(20):11816-21.
- Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, *et al.*: Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001;412:341-346.
- Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, *et al.*: Tcl1 Expression in Chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 2006; 66: 11590–11593
- Piris MA, Mollejo M, Campo E, *et al.*: A marginal zone pattern may be found in different varieties of non-Hodgkin's lymphoma: the morphology and immunohistology of splenic involvement by B-cell lymphomas simulating splenic marginal zone lymphoma. *Histopathology*. 1998;33(3):230-9.
- Preudhomme C, Roumier C, Hildebrand MP, *et al.*: Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Oncogene* 2000;19:2023-2032.
- Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, *et al.*: Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* 2001;25(4):443-51.
- Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, *et al.*: Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res*. 2006;30(5):643-7.
- Reinhart BJ, Slack FA, Basson M, *et al.*: The 21 nucleotide let-7 RNA regulates C. elegans developmental timing. *Nature* 2000; 403: 901–906.

- Rodriguez A, Martinez N, Camacho FI, *et al.*: Variability in the degree of expression of phosphorylated I κ B α in CLL cases with nodal involvement. *Clinical Cancer Res* 2004;10:6796-6806
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, *et al.*: Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639-1647.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, *et al.*: Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346(25):1937-47.
- Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, *et al.*: The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003;3:185-197.
- Saadoun D, Suárez F, Lefrere F, *et al.*: Splenic lymphoma with villous lymphocytes, associated with type II cryoglobulinemia and HCV infection: a new entity? *Blood* 2005; 105:74-6.
- Schmid C, Kirkham N, Diss T, *et al.*: Splenic marginal zone cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 1992;16(5):455-66.
- Serova M, Ghoul A, Benhadji KA, *et al.*: Preclinical and clinical development of novel agents that target the protein kinase C family. *Semin Oncol.* 2006;33(4):466-78. Review
- Shen HM, Peters A, Baron B, *et al.*: Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science.* 1998;280(5370):1750-2.
- Smalheiser NR: EST analyses predict the existence of a population of chimeric microRNA precursor-mRNA transcripts expressed in normal human and mouse tissues. *Genome Biol* 4(7): 403.
- Solé F, Woessner S, Florensa L, *et al.*: Frequent involvement of chromosomes 1, 3, 7 and 8 in splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 1997;98(2):446-9.
- Sole F, Salido M, Espinet B, *et al.*: Splenic marginal zone B-cell lymphomas: two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7q. *Haematologica* 2001; 86: 71–77.
- Sonoki T, Harder L, Horsman DE, *et al.*: Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies. *Blood* 2001; 98: 2837–2844.
- Spencer J, Finn T, Isaacson PG: Human Peyer's patches: an immunohistochemical study. *Gut* 1986;27(4):405-10.
- Stilgenbauer S, Dohner K, Bentz M, *et al.*: Molecular cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 1998;76(3-4):101-10.
- Stratton MR.:The p53 gene in human cancer. *Eur J Cancer* 1992;28(1):293-5. Review.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.*: 4^a ed. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Ed. IARC. Lyon 2008.

Taddesse-Heath L, Pittaluga S, Sorbara L, *et al.*: Marginal zone B-cell lymphoma in children and young adults. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 522–531.

Teitell MA.: The TCL1 family of oncoproteins: co-activators of transformation. *Nat Rev Cancer* 2005;5(8):640-8. Review

Thieblemont C, Felman P, Berger F, *et al.*: Treatment of splenic marginal zone B-cell lymphoma: an analysis of 81 patients. *Clin Lymphoma* 2002; 3: 41–47.

Thieblemont C, Felman P, Callet-Bauchu E, *et al.* : Splenic marginal-zone lymphoma: a distinct clinical and pathological entity. *Lancet Oncol.* 2003;4:95-103.

Thieblemont C, Nasser V, Felman P, *et al.*: Small lymphocytic lymphoma, marginal zone B-cell lymphoma, and mantle cell lymphoma exhibit distinct gene-expression profiles allowing molecular diagnosis. *Blood* 2004;103:2727-2737.

Tierens A, Delabie J, Michiels L, *et al.*: Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion. *Blood.* 1999;93(1):226-34.

Tilstone C. DNA microarrays: vital statistics. *Nature* 2003;424(6949):610-2.

Tracey L, Villuendas R, Ortiz P, *et al.* Identification of genes involved in resistance to interferon-alpha in cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 2002;161:1825-1837.

Tracey L, Perez-Rosado A, Artiga MJ, *et al.*: Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively. *J Pathol* 2005;206(2):123-34.

Trentin L, Agostini C, Facco M, *et al.*: The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *J Clin Invest.* 1999;104(1):115-21.

Troen G, Nygaard V, Jenssen TK, *et al.*: Constitutive expression of the AP-1 transcription factors c-jun, junD, junB, and c-fos and the marginal zone B-cell transcription factor Notch2 in splenic marginal zone lymphoma. *J Mol Diagn* 2004;6: 297-307

Van den Oord JJ, de Wolf-Peeters C, De Vos R, *et al.* : Immature sinus histiocytosis. Light- and electron-microscopic features, immunologic phenotype, and relationship with marginal zone lymphocytes. *Am J Pathol.* 1985;118(2):266-77.

Van Huyen JP, Molina T, Delmer A, *et al.*: Splenic marginal zone lymphoma with or without plasmacytic differentiation. *Am J Surg Pathol.* 2000 ;24(12):1581-92.

Wallace S, Bedu-Addo G, Rutherford TR, *et al.*: Serological similarities between hyperreactive malarial splenomegaly and splenic lymphoma in west Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 463-7.

Watanabe A, Cornelison R, Hostetter G.: Tissue microarrays: applications in genomic research. *Expert Rev Mol Diagn* 2005;5(2):171-81.

Xu P, Vernooij SY, Guo M, *et al.*: The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 2003; 13(9): 790-5.

Yamamoto N, Takeshita K, Shichijo M, *et al.*: The orally available spleen tyrosine kinase inhibitor 2-[7-(3,4-dimethoxyphenyl)-imidazo[1,2-c]pyrimidin-5-ylamino]nicotinamide dihydrochloride (BAY 61-3606) blocks antigen-induced airway inflammation in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:1174-1181.

Yeang CH, Ramaswamy S, Tamayo P, *et al.*: Molecular classification of multiple tumor types. *Bioinformatics* 2001;17 Suppl 1:S316-22.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR, *et al.*: Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003;17: 3011-3016.

Yuan H, Mao J, Li L, *et al.*: Suppression of glycogen synthase kinase activity is not sufficient for leukemia enhancer factor-1 activation. *J Biol Chem.* 1999; 274(43):30419-23.

Zhang L, Huang J, Yang N, *et al.*: microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *PNAS* 2006;103(24):9136-41.

Zhu D, Oscier DG, Stevenson FK.: Splenic lymphoma with villous lymphocytes involves B cells with extensively mutated Ig heavy chain variable region genes. *Blood.* 1995 ;85(6):1603-7.



I. ARTÍCULO 1

Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers

Elena Ruiz-Ballesteros, Manuela Mollejo, Antonia Rodríguez, Francisca I. Camacho, Patrocinio Algara, Nerea Martínez, Marina Pollán, Abel Sanchez-Aguilera, Javier Menárguez, Elías Campo, Pedro Martínez, Marisol Mateo y Miguel Angel Piris.

Blood 2005;106(5):1831-1838.

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/reprint/106/5/1831>

II. ARTÍCULO 2

MicroRNA losses in the frequently deleted region of 7q in SMZL.

Elena Ruiz-Ballesteros, Manuela Mollejo, Marisol Mateo, Patrocinio Algara, Pedro Martínez y Miguel Angel Piris.

Leukemia 2007;21(12):2547-2549.

<http://www.nature.com/leu/journal/v21/n12/pdf/2404853a.pdf>

III. RELACIÓN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS.

Tracey L, Aggarwal M, García-Cosío M, Villuendas R, Algara P, Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A, García JF, Rodríguez A, Camacho FI, Martínez N, **Ruiz-Ballesteros E**, Mollejo M, Piris MA. Somatic hypermutation signature in B-cell low-grade lymphomas. *Haematologica*. 2008; 93(8):1186-94.

Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Mateo M, Algara P, Martínez P, Piris MA. MicroRNA losses in the frequently deleted region of 7q in SMZL. *Leukemia*. 2007;21(12):2547-9.

Mollejo M, Camacho FI, Algara P, **Ruiz-Ballesteros E**, García JF, Piris MA. Nodal and splenic marginal zone B cell lymphomas. *Hematol Oncol*. 2005;23(3-4):108-18. Review.

Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Rodríguez A, Camacho FI, Algara P, Martínez N, Pollán M, Sánchez-Aguilera A, Menarguez J, Campo E, Martínez P, Mateo M, Piris MA. Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood*. 2005;106(5):1831-8.

Tracey L, Pérez-Rosado A, Artiga MJ, Camacho FI, Rodríguez A, Martínez N, **Ruiz-Ballesteros E**, Mollejo M, Martínez B, Cuadros M, García JF, Lawler M, Piris MA. Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively. *J Pathol*. 2005;206(2):123-34.

Rodríguez A, Martínez N, Camacho FI, **Ruiz-Ballesteros E**, Algara P, García JF, Menarguez J, Alvaro T, Fresno MF, Solano F, Mollejo M, Martín C, Piris MA. Variability in the degree of expression of phosphorylated I kappa B alpha in chronic lymphocytic leukemia cases with nodal involvement. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6796-806.

Camacho FI, García JF, Cigudosa JC, Mollejo M, Algara P, **Ruiz-Ballesteros E**, Gonzalvo P, Martín P, Pérez-Seoane C, Sánchez-García J, Piris MA. Aberrant Bcl6 protein expression in mantle cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(8):1051-6.

Martínez N, Camacho FI, Algara P, Rodríguez A, Dopazo A, **Ruiz-Ballesteros E**, Martín P, Martínez-Climent JA, García-Conde J, Menarguez J, Solano F, Mollejo M, Piris MA. The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival. *Cancer Res*. 2003;63(23):8226-32.

Camacho FI, Algara P, Rodríguez A, **Ruiz-Ballesteros E**, Mollejo M, Martínez N, Martínez-Climent JA, González M, Mateo M, Caleo A, Sánchez-Beato M, Menarguez J, García-Conde J, Solé F, Campo E, Piris MA. Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood*. 2003;101(10):4042-6.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADNc: ADN codificante.

ARNm: ARN mensajero.

BCR: Receptor de células B.

CG: Centro Germinal.

FDR: Tasa de falsos positivos (*False Discovery Rate*).

FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia.

FRET: Fluorescencia tras transferencia de energía por resonancia.

H&E: Tinción inmunohistoquímica con Hematoxilina y Eoxina.

Ig: Inmunoglobulina.

IgV_H o IgV_L: Región variable de las cadenas pesadas (H) o ligeras (L) de inmunoglobulinas (Ig).

LBCG: Linfoma B de Células Grandes.

LBCP: Linfoma B de Células Pequeñas.

LEZM: Linfoma Esplénico de la Zona Marginal.

LCM: Linfoma de Células del Manto.

LF: Linfoma Folicular.

LLC-B: Leucemia Linfocítica Crónica tipo B.

LNH: Linfoma B no Hodgkin.

LOH: pérdida de heterozigosidad.

LPL: Linfoma Linfoplasmacítico.

LTB: Linfotoxina B; LTBR: Receptor de Linfotoxina B.

LZM: Linfoma de la Zona Marginal.

LZMG: Linfoma de la Zona Marginal Ganglionar o Nodal.

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas.

miRNA: MicroRNA.

NK: *Natural Killer*.

qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real.

RMCD: Región Mínima de Común Deleción.

RR: Riesgo Relativo; **IC:** Intervalo de confianza.

SG: Supervivencia Global.

SLP: Supervivencia Libre de Progresión.

TCR: Receptor de células T.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

TRAF: Factor asociado al receptor TNF.

7q: Brazo largo del cromosoma 7.